



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
DE PLANTAS

Estudio de la actividad *in vivo* de la gentisato-
glicosiltransferasa GAGT y la posible glicosiltransferasa
Twi1 de tomate mediante expresión transitoria en
Nicotiana benthamiana

TRABAJO FIN DE MÁSTER
“BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
Y CELULAR DE PLANTAS”

PRESENTADO POR:

Laura Campos Beneyto

DIRECTORES:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, septiembre de 2011



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Dña. María Purificación Lisón Párraga, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. Ismael Rodrigo Bravo, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada *“Estudio de la actividad in vivo de la genticato-glicosiltransferasa GAGT y la posible glicosiltransferasa Twi1 de tomate mediante expresión transitoria en Nicotiana benthamiana”* ha sido realizada por Laura Campos Beneyto bajo nuestra dirección y constituye su Trabajo Final de Máster.

Por tanto, **AUTORIZAN** la presentación y defensa de este trabajo.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Valencia a dos de septiembre de dos mil once.

Fdo: Dr. M^a Purificación Lisón Párraga

Fdo: Dr. Ismael Rodrigo Bravo

*A todos aquellos que me han ayudado
y acompañado este último año...*

ABREVIATURAS

ANI:	ácido anísico
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEVd:	Viroide de la Exocortis de los Cítricos
ET:	etileno
GA:	ácido gentísico
GAGT:	glicosiltransferasa de ácido gentísico
GT:	glicosiltransferasa
HPLC:	cromatografía líquida de altas prestaciones
HR:	respuesta hipersensible
JA:	ácido jasmónico
MNSV:	<i>Melon Necrotic Spot Virus</i>
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PNRSV:	<i>Prunus Necrotic RingSpot Virus</i>
PR:	<i>Pathogenesis-Related</i>
RMN:	resonancia magnética nuclear
ROS:	especies reactivas de oxígeno
RT-PCR:	transcripción reversa de RNA seguida de PCR
SA:	ácido salicílico
SAR:	resistencia sistémica adquirida
TMV:	Virus del Mosaico del Tabaco
ToMV:	Virus del Mosaico del Tomate
Tw1:	proteína de tomate inducida por herida
PSPG:	<i>Plant Secondary Product Glycosyltransferase</i>
RPL2:	proteína ribosomal L2
VIGS:	<i>Virus-Induced Gene Silencing</i>

ÍNDICE

<i>I. Introducción</i>	1
<i>I.1. El sistema defensivo de las plantas</i>	1
I.1.1. Consideraciones generales.....	1
I.1.2. Principales moléculas señal de la respuesta defensiva de las plantas	2
I.1.2.1. Consideraciones generales.	2
I.1.2.2. El ácido salicílico.	3
 <i>I.2. El ácido gentísico como molécula señal en la respuesta defensiva de las plantas</i>	6
 <i>I.3. La glicosilación en plantas</i>	10
I.3.1. Generalidades sobre las glicosiltransferasas.....	11
I.3.2. Implicaciones fisiológicas de la glicosilación.....	12
I.3.3. La glicosilación en la respuesta defensiva.....	13
 <i>II. Objetivos</i>	17
 <i>III. Materiales y Métodos</i>	19
<i>III.1. Material vegetal y condiciones de cultivo</i>	19
<i>III.2. Plásmidos y cepas bacterianas</i>	19
<i>III.3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos</i>	20
III.3.1. Purificación de plásmidos bacterianos.....	20
III.3.2. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.....	20
III.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	20

III.3.4. Técnicas de clonaje	20
III.3.5. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	22
III.3.6. Extracción de RNA total de plantas.....	22
III.3.7. Reacciones de amplificación (RT-PCR)	22
III.3.8. Secuenciación de DNA	23
III.3.9. Recursos informáticos.....	24
 <i>III.4. Extracción y detección de proteínas recombinantes</i>	 24
III.4.1. Electroforesis desnaturante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)	24
III.4.2. <i>Western blot</i>	24
III.4.3. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana.....	25
 <i>III.5. Extracción de compuestos fenólicos.....</i>	 25
III.5.1. Compuestos fenólicos libres	25
III.5.2. Compuestos fenólicos conjugados.....	26
 <i>III.6. Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	 26
 <i>III.7. Experimentos de expresión transitoria y tratamientos.....</i>	 27
 <i>III.8. Obtención de plantas transgénicas.....</i>	 29
III.8.1. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
III.8.2. Transformación de plantas de tomate	29

IV. Resultados y Discusión	31
<i>IV.1. Amplificación y clonación del cDNA de GAGT y Twi1</i>	<i>32</i>
<i>IV.2. Estudio de la actividad in vivo de GAGT y Twi1 mediante expresión transitoria en Nicotiana benthamiana</i>	<i>34</i>
<i>IV.2.1. Experimento de expresión transitoria en Nicotiana benthamiana</i>	<i>34</i>
<i>IV.2.2. Estudio de la expresión transitoria del cDNA recombinante de GAGT y Twi1 en plantas de Nicotiana benthamiana</i>	<i>35</i>
<i>IV.2.3. Estudio de la actividad enzimática de GAGT y Twi1 en la expresión transitoria de pGWB8_GAGT y pGWB9_Twi1</i>	<i>37</i>
<i>IV.2.4. Detección de las proteínas recombinantes GAGT y Twi1 en expresión transitoria en plantas de Nicotiana benthamiana</i>	<i>45</i>
<i>IV.3. Obtención de plantas transgénicas GAGT de tomate</i>	<i>46</i>
<i>IV.3.1. Transformación genética de tomate "Moneymaker"</i>	<i>47</i>
<i>PERSPECTIVAS DE FUTURO</i>	<i>49</i>
V. Conclusiones	51
VI. Bibliografía	53
VII. Anexos	59

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS**Introducción:**

Figura 1. Biosíntesis del ácido salicílico en plantas.....	4
Figura 2. Estructura del SA 2-O- β glucósido	5
Figura 3. Esquema de la síntesis de GA a partir de SA en la bacteria <i>Ralstonia</i> sp.	7
Figura 4. Estructura del GA 5-O- β xilósido.....	9
Figura 5. Secuencia consenso de las glicosiltransferasas (GTs)	12
Tabla 1. Inducción de GA y SA en diferentes interacciones planta-patógeno	8

Materiales y Métodos:

Figura 6. Esquema de la reacción LR del sistema Gateway (Invitrogen)	21
Figura 7. Diagrama temporal de expresión transitoria y tratamientos exógenos con GA o SA	28
Figura 8. Diagrama temporal de la transformación de tomate.....	30

Resultados y discusión:

Figura 9. Obtención de los clones de expresión para GAGT y Twi1	33
Figura 10. Estudio de la expresión de los cDNAs <i>GAGT</i> y <i>Twi1</i> recombinantes en plantas de <i>N. benthamiana</i>	36
Figura 11. Compuestos fenólicos presentes en extractos de hojas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas y tratadas exógenamente con GA o SA, empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno	37
Figura 12. Acumulación de GA libre y total en plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinoculadas con pGWB8_ <i>GAGT</i> /p19 y sus correspondientes controles tras tratamiento con GA 2 mM	39
Figura 13. Acumulación de SA libre y total en plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinoculadas con pGWB8_ <i>GAGT</i> /p19 y sus correspondientes controles tras tratamiento con SA 1 mM.....	40
Figura 14. Acumulación de GA libre y total en plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinoculadas con pGWB8_ <i>GAGT</i> /p19 y sus correspondientes controles tras tratamiento con SA 1 mM.....	41
Figura 15. Detección de las proteínas recombinantes GAGT y Twi1 presentes en plantas agroinfiltradas de <i>N. benthamiana</i>	45
Figura 16. Cultivo con presión selectiva de la transformación de tomate cv. Moneymaker con la construcción pGWB8_ <i>GAGT</i>	48

Tabla 2. Acumulación de GA en plantas tratadas con GA en expresión transitoria del gen <i>GAGT</i> en <i>N. benthamiana</i>	42
Tabla 3. Acumulación de SA en plantas tratadas con SA en expresión transitoria del gen <i>GAGT</i> en <i>N. benthamiana</i>	42
Tabla 4. Acumulación de GA en plantas tratadas con SA en expresión transitoria del gen <i>GAGT</i> en <i>N. benthamiana</i>	42

Anexos:

Figura A1. Curvas patrón para el ácido gentísico (GA), ácido salicílico (SA) y ácido anísico (ANI)	59
Figura A2. Curva de calibración lineal de ácido gentísico (GA) empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno, en el rango de concentraciones de trabajo (0 – 5 nmoles)	60
Figura A3. Curva de calibración lineal de ácido salicílico (SA) empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno, en el rango de concentraciones de trabajo (0 – 5 nmoles)	60

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El sistema defensivo de las plantas

I.1.1. Consideraciones generales

La supervivencia de los seres vivos en la naturaleza depende, en gran medida, de su capacidad de adaptación al entorno. Debido a la inmovilidad que las caracteriza, las plantas se han visto obligadas a desarrollar a lo largo de la evolución estrategias muy diversas con el fin de hacer frente al estrés, tanto abiótico (sequía, salinidad, temperaturas extremas o contaminación) como biótico (herbívoros, insectos y gran cantidad de microorganismos). En su ambiente natural, las plantas se enfrentan a un elevado número de microorganismos patogénicos tales como hongos, bacterias, virus y viroides. Sin embargo, pocos son los que consiguen atacar y hacer enfermar a la misma. Las plantas son capaces de protegerse frente a este tipo de ataques, consiguiendo así que la enfermedad sea la excepción y no la regla.

Los mecanismos de defensa de la planta son complejos y están constituidos por múltiples niveles, siendo muy eficaces frente a un amplio abanico de organismos patógenos. Estos mecanismos de defensa incluyen tanto barreras físicas y químicas pre-existentes en la planta sin necesidad de producirse la infección (resistencia pasiva), como una serie de reacciones inducidas a causa del reconocimiento por parte de la planta de un inductor patogénico (resistencia activa).

La resistencia pasiva se compone de una serie de elementos constitutivos, unos de naturaleza estructural (topografía de la superficie foliar, composición y estructura de la cutícula, tricomas, estructura de los estomas, pared celular, etc.) y otros de naturaleza química. Estos compuestos químicos pueden resultar directamente tóxicos para el patógeno (compuestos alcaloides, fenólicos, proteínas de defensa, etc.) o bien tratarse de precursores no tóxicos a partir de los cuales se libera la forma tóxica como consecuencia de la infección, como es el caso de la liberación de ácido cianhídrico a partir de cianógenos. Esta es la razón por la cual pueden encontrarse en las plantas miles de compuestos químicos diferentes relacionados con mecanismos de defensa (Baker *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 2001, Staal y Dixelius, 2007).

Por otro lado, la resistencia activa suele ser inducida de forma específica, gracias a ciertos mecanismos que poseen las plantas mediante los cuales son capaces de reconocer el inductor patogénico ("*elicitor*") y, en consecuencia, desplegar una red de señalización encargada de activar los mecanismos de defensa inducibles (Conejero *et al.*, 1990; Ebel y Cosio, 1994;

Nürnberg, 1999). Algunas de las moléculas más importantes que intervienen en esta red de señalización son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), que inducen resistencia activa en la planta frente a ciertos patógenos (Pieterse *et al.*, 2001; Kunkel y Brooks, 2002).

Las enfermedades producidas por patógenos y plagas de insectos reducen en gran medida el rendimiento de los cultivos, afectando a la producción de alimentos, fibras y biocombustibles (Jones y Dangl, 2006). Esto ha provocado que, tanto las distintas enfermedades como las moléculas implicadas en la señalización de la respuesta de las plantas, fundamentalmente el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), hayan sido estudiadas con detalle (Zhao y Qi, 2008).

I.1.2. Principales moléculas señal de la respuesta defensiva de las plantas

I.1.2.1. Consideraciones generales

Las fitohormonas controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento y desarrollo de las plantas. De igual forma, juegan un papel esencial en la respuesta frente a diferentes tipos de estrés. Se ha visto que la infección de plantas con patógenos de distinta naturaleza provoca variaciones en el nivel de diferentes hormonas (Adie *et al.*, 2007). Tres principales hormonas, ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, resultan de gran importancia en la regulación de la respuesta defensiva de la planta frente a estrés, tanto abiótico como biótico, herida y exposición a ozono (Lorenzo y Solano, 2005; Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant, 2007; Balbi y Devoto, 2008). Además, en nuestro laboratorio fue identificado el ácido gentísico, un compuesto de naturaleza fenólica y de estructura similar a la del ácido salicílico, pero con un papel diferencial en lo que se refiere a la activación de la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos (Bellés *et al.*, 1999). En siguientes apartados se desarrollará con más detalle el papel de este compuesto en la respuesta frente a ataques patogénicos de las plantas.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado la implicación de otras fitohormonas en las rutas de señalización de la respuesta defensiva en plantas, menos conocidas en este contexto, como el ácido abscísico, las auxinas, el ácido giberélico, las citoquininas, los brasinoesteroides, así como las hormonas peptídicas (Bari y Jones, 2009). En las plantas existen

diferentes rutas de señalización defensiva, pero éstas no actúan de manera independiente, sino que están implicadas en una compleja red de señalización.

Debido a la temática del presente trabajo, centraremos la atención en uno de los principales mediadores de la respuesta patogénica, el ácido salicílico (SA) y en su derivado metabólico ácido gentísico (GA). A continuación se explicará en detalle las funciones que el ácido salicílico (SA) desarrolla en la planta frente a ataques patogénicos. El apartado que le sigue está dedicado al ácido gentísico (GA), donde se tratará su papel como posible molécula señal de la respuesta defensiva de las plantas.

I.1.2.2. El ácido salicílico

El ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico, SA) es un compuesto fenólico presente en una gran variedad de plantas. Este compuesto es, además, de especial interés para la industria farmacéutica debido, entre otros, a su efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Pierpoint, 1997; Mackowiak, 2000).

En plantas, el SA está implicado en multitud de procesos relacionados con la defensa frente a patógenos biótros y otros factores de estrés, así como en diversos procesos de desarrollo (Dempsey *et al.*, 1999; Álvarez, 2000; Shah, 2003; Glazebrook, 2005; Loake y Grant, 2007). Sin embargo, su función fisiológica mejor caracterizada es la de la activación de programas de defensa inducibles, confiriendo a la planta resistencia frente a patógenos. El SA parece desempeñar un papel fundamental en la activación de la respuesta hipersensible (HR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) de las plantas, además de resultar necesario para el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2003). Por un lado, la expresión de los genes de defensa viene precedida por un aumento en los niveles de SA o de sus conjugados (Delaney *et al.*, 1994). Por otra parte, la aplicación exógena de SA, o de algún análogo funcional sintético, promueve en la planta dos fases de expresión génica. En la primera fase, a las 2-3 horas después del tratamiento, se expresan enzimas detoxificantes (glutathione-S-transferasas, glicosiltransferasas, etc.) que ayudan a proteger las células del estrés oxidativo (Horvath y Chua, 1996). En la segunda fase, se produce la activación de genes codificantes de proteínas de defensa, entre las que destacan las proteínas PR (*Pathogenesis-Related*), que tiene lugar entre 12-16 horas después de la aplicación del SA (Sticher *et al.*, 1997; Uquillas *et al.*,

2004). Esta aplicación exógena de SA, y por consiguiente expresión de genes PR, hacen más resistente a la planta frente a un ataque patogénico (Shah, 2003).

Hasta hace unos años, estaba ampliamente admitido que el SA era sintetizado en la planta a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 1), que acontece en el cloroplasto (Sticher *et al.*, 1997). Sin embargo, actualmente, existen pruebas que apoyan que la ruta biosintética del isocorismato, que tiene lugar en el citosol, es la fuente principal de SA durante la infección patogénica y el establecimiento de la SAR (Willdermuth *et al.*, 2001).

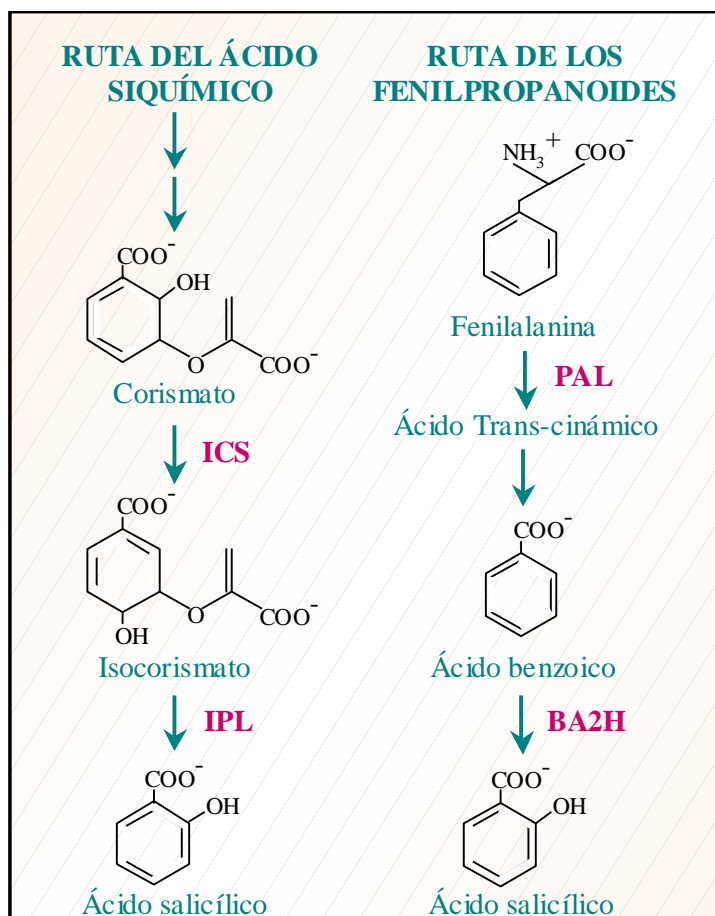


Figura 1. Biosíntesis del ácido salicílico en plantas. Ruta de biosíntesis a partir del ácido siquímico, que se desarrolla en el cloroplasto (izquierda) y ruta de biosíntesis a partir de la fenilalanina, que sucede en el citosol (derecha). PAL: Fenil alanina amonio liasa; BA2H: Ácido benzoico 2-hidroxilasa; ICS: Isocorismato sintasa; IPL: Isocorismato-piruvato liasa. Adaptado de Shah, 2003.

La mayor parte del SA libre en la célula se conjuga con glucosa para formar SA-O- β -glucósido (Enyedi *et al.*, 1992; Malamy *et al.*, 1992) (Figura 2). En general, éste queda recluido

en el interior de la vacuola, evitando así su posible efecto tóxico. Durante una infección patogénica, el SA conjugado se libera por la acción de glucosil-hidrolasas (Dean *et al.*, 2005). Sin embargo, avances recientes sugieren otras modificaciones de SA que proporcionan respuestas defensivas específicas, como es el caso de la conjugación del SA con aminoácidos, que tiene un importante papel en algunas respuestas defensivas (Nobuta *et al.*, 2007) o del metil-salicilato (MeSA), descrito como la señal móvil implicada en la activación de la SAR en tabaco (Park *et al.*, 2007). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia del SA en el desarrollo de la resistencia local y sistémica. En este sentido, ha sido clave la utilización de plantas transgénicas que no pueden acumular SA, denominadas *NahG*. Estas plantas sobre-expresan un gen bacteriano (salicilato hidroxilasa), que degrada el SA a catecol (Gaffney *et al.*, 1993). Debido a la ausencia de SA, estas plantas son incapaces de activar la SAR y, además, son más susceptibles al desarrollo de enfermedades que sus parentales (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995; Mur *et al.*, 1997).

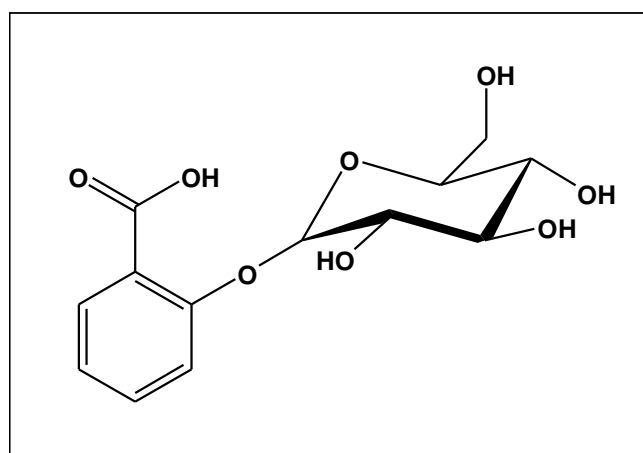


Figura 2. Estructura del SA 2-O- β glucósido

La interacción planta-patógeno puede ser de tipo compatible o incompatible. Cuando se produce un reconocimiento específico *gen-a-gen* entre la planta y el patógeno, se dice que la interacción es de tipo *incompatible*, ya que se activa de forma local la Respuesta Hipersensible (HR), que implica la necrosis del tejido afectado, de modo que el patógeno queda confinado en el lugar de entrada. Mientras, a nivel sistémico se crea un estado protector (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) frente a posibles nuevos ataques patogénicos. En el caso de que no ocurra tal reconocimiento, la interacción es denominada como de tipo *compatible*, en la cual el patógeno escapa a las respuestas defensivas locales, extendiéndose por la planta y provocando la

enfermedad (Nürnberg *et al.*, 2004; Thilmony *et al.*, 2006; Desender *et al.*, 2007; Balaji y Sessa, 2008).

Mientras la interacción de tipo incompatible ha sido ampliamente estudiada, siendo el SA la principal molécula señal implicada, existen muchos menos estudios en relación con la interacción compatible. En este tipo de interacción, aunque la planta es capaz de sintetizar y acumular PRs, así como de establecer una resistencia sistémica, lo hace más lentamente que en el caso de la interacción incompatible (Thilmony *et al.*, 2006; Desender *et al.*, 2007; Balaji y Sessa, 2008). Todo esto propicia una rápida expansión del patógeno por la planta y el consiguiente desarrollo de la enfermedad. En cualquier caso, se conoce muy poco acerca del mecanismo de señalización de la respuesta defensiva en este tipo de infecciones. Sin embargo, en algunos casos, se ha demostrado que el SA podría estar implicado en la activación de estas defensas (O'Donnell *et al.*, 2001; Loake y Grant, 2007).

1.2. El ácido gentísico (GA) como molécula señal en la respuesta defensiva de las plantas

El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) es un compuesto fenólico, formado a partir de la hidroxilación en C5 del ácido salicílico. La hidroxilación del ácido salicílico para dar lugar a ácido gentísico fue descrita por primera vez en tejido animal (Lutwak-Mann, 1943) y posteriormente, en microorganismos (Walker y Evans, 1952) y en plantas (Ibrahim y Towers, 1959). Desde entonces y hasta la fecha se han ido ampliando los conocimientos sobre el metabolismo de este compuesto en animales y microorganismos (Figura 3), sin embargo, en plantas el GA es todavía un gran desconocido.

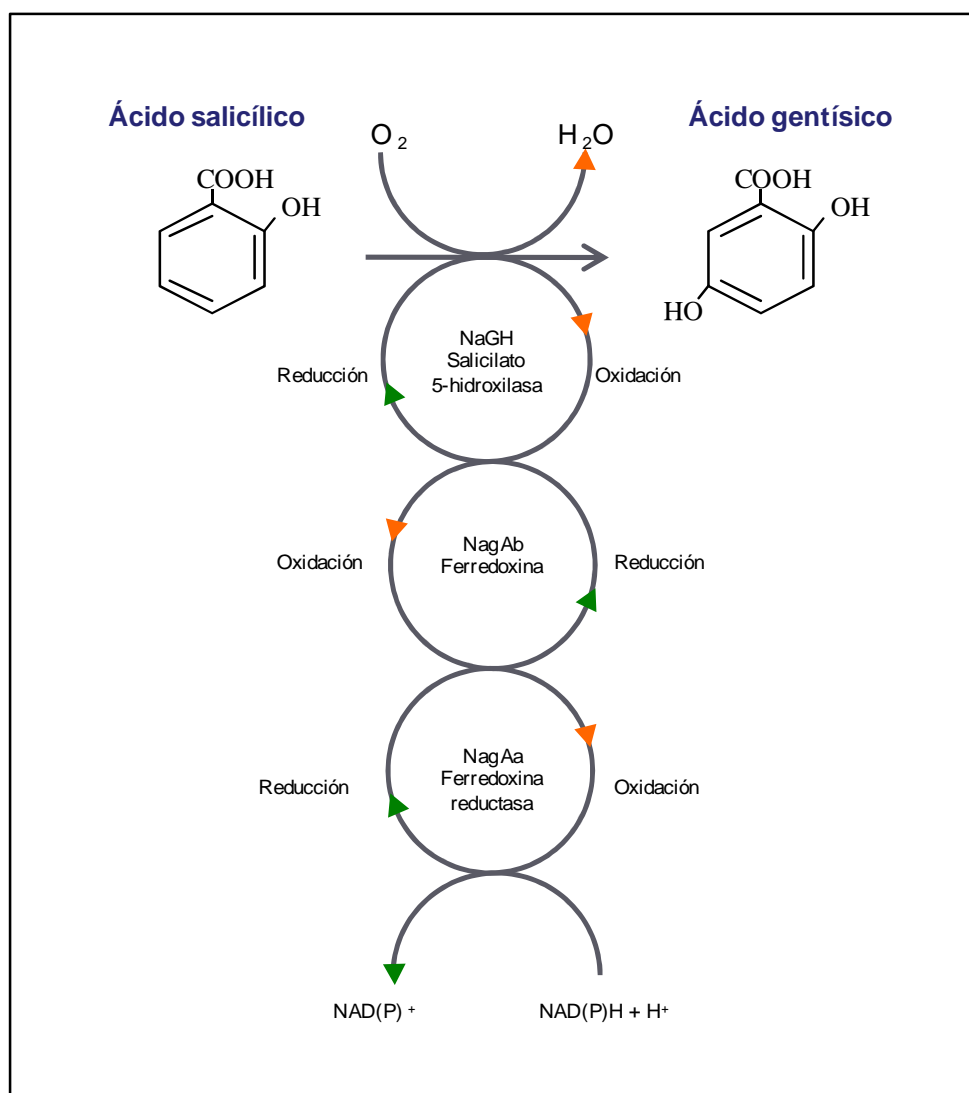


Figura 3. Esquema de la síntesis de GA a partir de SA en la bacteria *Ralstonia* sp.
Adaptado de Fuenmayor *et al.* (1998).

Hace unos años, se produjo en nuestro laboratorio un descubrimiento en relación con la respuesta defensiva de las plantas en infecciones compatibles (Bellés *et al.*, 1999) que ha abierto nuevas perspectivas en el conocimiento de este tipo de infección. Los estudios se centraron en compuestos fenólicos ya que, en numerosas ocasiones, ha sido descrita su importancia como armas defensivas *per se* (Lattanzio *et al.*, 1994; Maher *et al.*, 1994) y como moléculas señal de la respuesta defensiva, como es el caso del SA, claramente implicado en el establecimiento de la SAR (Delaney *et al.*, 1994). El sistema experimental empleado fue una interacción de tipo compatible, concretamente, plantas de tomate infectadas con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd) (Conejero y Granell, 1986; Granell *et al.*, 1987). La comparación

entre los extractos fenólicos de plantas control y plantas infectadas puso en evidencia la gran acumulación de un compuesto, diferente al SA, identificado mediante $[^1\text{H}]\text{-RMN}$ como ácido genticónico (GA). Con la aparición de los síntomas propios de la infección por CEVd, la planta de tomate comenzaba a acumular GA, alcanzando niveles mucho mayores que los de SA (Bellés *et al.*, 1999). Los mismos resultados se obtuvieron en otra interacción de tipo compatible, la resultante de infectar plantas de tomate con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV). Sin embargo, no se observó acumulación de GA y sí de SA en este mismo huésped, al realizar una infección necrotizante (interacción incompatible) con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Tabla 1). Por otra parte, al tratar exógenamente con GA, las plantas de tomate mostraban una acumulación de proteínas PR, concretamente de P23, P32 y P34. Estas proteínas no se inducían, en cambio, con SA (Bellés *et al.*, 1999). Todos estos resultados sugerían que el GA podría estar actuando como una molécula señal, complementaria al SA, en la activación de las defensas en tomate.

En este sentido, nuestro grupo ha observado que el GA también se acumula como consecuencia de infecciones no necrotizantes en otras especies vegetales, como *Gynura aurantiaca* y *Cucumis sativus* (pepino) aunque, a diferencia de lo que ocurre en tomate, en estos casos la acumulación de GA va acompañada de una considerable acumulación de SA (Tabla 1). Por el contrario, al infectar *Cucumis sativus* con una dosis elevada de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, se produce en la zona inoculada una rápida necrosis (HR-like), que no conlleva un aumento significativo de GA, pero sí de SA, corroborando que el incremento de los niveles de GA podría estar asociado a interacciones no necrotizantes. Además, tanto en pepino como en *Gynura*, los tratamientos exógenos con GA y SA inducen la biosíntesis de actividades defensivas distintas. Así, únicamente el GA es capaz de inducir fuertemente la actividad polifenol-oxidasa en pepino, mientras que sólo el SA activa la PR1 y la PR2 en *Gynura* y la actividad quitinasa en pepino (Bellés *et al.*, 2006).

SISTEMA PLANTA-PATÓGENO	TIPO DE INTERACCIÓN	INFECCIÓN	INDUCCIÓN DE GA	INDUCCIÓN DE SA	REFERENCIA
Tomate-CEVd	compatible	sistémica	+++	+	Bellés <i>et al.</i> , 1999
Tomate-ToMV	compatible	sistémica	++	-	Bellés <i>et al.</i> , 1999
Tomate- <i>Pseudomonas syringae</i>	incompatible	HR	-	+	Bellés <i>et al.</i> , 1999
Pepino-PNRSV	compatible	sistémica	++	+	Bellés <i>et al.</i> , 2005
Pepino- <i>Pseudomonas syringae</i>	incompatible	HR-like	-	+	Bellés <i>et al.</i> , 2005
Gynura-CEVd	compatible	sistémica	++	++	Bellés <i>et al.</i> , 2005

Tabla 1. Inducción de GA y SA en diferentes interacciones planta-patógeno.

Otro estudio más reciente vuelve a mostrar la importante acumulación de GA que se produce en plantas de tomate tras una infección de tipo compatible (López-Gresa *et al.*, 2010). En el estudio se empleó la resonancia magnética nuclear en combinación con un análisis de datos multivariable para analizar los cambios metabólicos implicados en la interacción planta-patógeno. Se realizó una infección de plantas de tomate con CEVd y posteriormente se analizaron extractos crudos de las hojas mediante RMN. Esta técnica analítica permitió la identificación de diferentes metabolitos implicados en la respuesta sistémica de la interacción planta-patógeno pero, además, los resultados concluyeron que el GA era el metabolito que más se acumulaba diferencialmente como consecuencia de la infección con el viroide (López-Gresa *et al.*, 2010).

Al igual que ocurre con muchos otros hidroxibenzoatos derivados del metabolismo secundario, el GA se acumula en la planta en forma de glicoconjugado (unido a una molécula de azúcar). Sin embargo, mientras el SA se encuentra mayoritariamente conjugado a glucosa, el GA se conjuga mayoritariamente a xilosa (Fayos *et al.*, 2006) (Figura 4). Esta conjugación es llevada a cabo en tomate por una actividad glicosiltransferasa de ácido gentísico, denominada GAGT (*Gentisic Acid Glycosyl-Transferase*), aislada y caracterizada en nuestro laboratorio (Tárraga *et al.*, 2010). Otros estudios han identificado ácido gentísico conjugado a xilosa en la raíz de *Medicago truncatula* (Stochmal *et al.*, 2009).

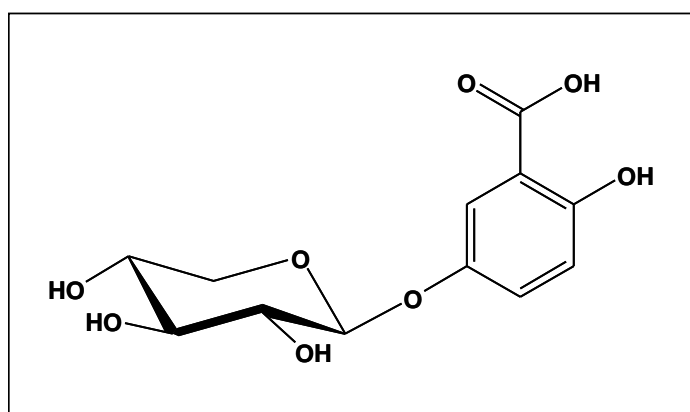


Figura 4. Estructura del GA 5-O- β xilósido

Todos los datos expuestos, unidos al hecho de que el GA posee una importante actividad antifúngica *per se* (Lattanzio *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2007) y considerando que en distintas especies vegetales (*Solanum lycopersicum*, *Gynura aurantiaca*, *Cucumis sativus*) se acumula a elevados niveles como consecuencia de interacciones compatibles y que, además, induce la expresión de proteínas defensivas diferentes a las reguladas por SA, sugieren que el GA podría actuar en plantas como una señal adicional y complementaria al SA, en la activación de la respuesta defensiva en infecciones compatibles.

1.3. La glicosilación en plantas

Las plantas, a través del metabolismo secundario, producen una gran diversidad de compuestos de bajo peso molecular. Además de la enorme cantidad de rutas metabólicas implicadas, la gran diversidad de estos compuestos es aún mayor gracias a reacciones adicionales de hidroxilación, metilación, acilación o conjugación (Gachon *et al.*, 2005). La glicosilación o conjugación a una molécula de azúcar es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios, y la llevan a cabo unos enzimas denominados glicosiltransferasas (GTs). El estudio de GTs de plantas resulta de gran interés en la actualidad, debido a la propia glicosilación y su función fisiológica, así como su potencial aplicación en Biotecnología (Wang, 2009; Roychoudhury y Pohl, 2010). Las glicosiltransferasas se clasifican según su secuencia y plegamiento, así como por la estereoquímica de la reacción que catalizan (Coutinho *et al.*, 2003). Las plantas poseen más genes codificantes de GTs que ningún otro organismo secuenciado hasta la fecha. Ello se atribuye a la compleja red de polisacáridos que forma la pared celular y que requiere multitud de GTs para su biosíntesis, pero también a la enorme cantidad de metabolitos secundarios glicosilados que existen en las plantas (Lim y Bowles, 2004; Mohnen, 2008). La mayoría de las GTs son codificadas por grandes familias multigénicas, que en algunos casos comprenden cientos de genes. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, la familia 1, que engloba las GTs implicadas en la glicosilación de metabolitos secundarios, está compuesta por 120 genes, mientras que en *Medicago truncatula* se han identificado 165 (Paquette *et al.*, 2003; Achnine *et al.*, 2005). En la actualidad se conoce la secuencia de miles de GTs, pero en pocos casos se ha llevado a cabo su caracterización biológica.

I.3.1. Generalidades sobre las glicosiltransferasas

La mayoría de las secuencias de las GTs se conocen gracias a los avances de la Genómica. Las posibles GTs son detectadas empleando como sondas regiones consenso y, posteriormente, se expresan y caracterizan *in vitro* (Lim *et al.*, 2001, 2002). En dichas condiciones, estas enzimas muestran una menor especificidad frente al sustrato aceptor del azúcar, lo que dificulta la identificación de los verdaderos sustratos *in vivo* (Achnine *et al.*, 2005). Por ello se emplean también otros abordajes, tales como el silenciamiento inducido por virus (*Virus Induced Gene Silencing*, VIGS) (Lee *et al.*, 2009) o la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresen o silencien glicosiltransferasas (Chong *et al.*, 2002; Gachon *et al.*, 2004; Lorenc-Kukula *et al.*, 2005), con el fin de llevar a cabo su caracterización.

En la identificación de nuevas GTs se utilizan herramientas que actúan a nivel transcripcional o metabólico (*microarrays* y perfiles metabólicos) (Achnine *et al.*, 2005; Tohge *et al.*, 2005). Por otra parte, el desarrollo de la Bioinformática como resultado de los proyectos genómicos, junto con las nuevas y mejores técnicas de clonaje, ha permitido la identificación de un elevado número de GTs durante las dos últimas décadas (Fasmer Hansen *et al.*, 2010).

La especificidad de sustrato de estas enzimas suele ser mayor en cuanto al donante del azúcar. En este sentido, el sustrato más empleado por las GTs suele ser la uridín-difosfato-glucosa (UDPG), aunque existen GTs que emplean otros azúcares activados con UDP (Vogt y Jones, 2000).

Las GTs implicadas en la glicosilación de metabolitos secundarios en plantas son enzimas citosólicos (Hart *et al.*, 2007). Estas glicosiltransferasas presentan un motivo, de aproximadamente 40 aminoácidos, altamente conservado (entre un 60 y un 80% de similitud), denominado PSPG (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*) (Hughes y Hughes, 1994) (Figura 5). Este motivo incluye también una secuencia, de unos 25 aminoácidos, que suele estar presente en todas las GTs. Dicha secuencia, localizada en la región C-terminal de la proteína, parece ser el sitio de unión del uridín-difosfato (UDP). Varios estudios han demostrado que ciertas mutaciones en los aminoácidos de estas secuencias conservadas afectan a la interacción proteína-UDP (Kubo *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2004). Exceptuando el motivo PSPG, la similitud de secuencia entre las GTs es, por lo general, muy baja (en torno al 10%). En cuanto al extremo N-terminal, parece que éste podría ser el encargado de interaccionar con el sustrato aceptor del azúcar (Moehs *et al.*, 1997; Lim y Bowles, 2004).

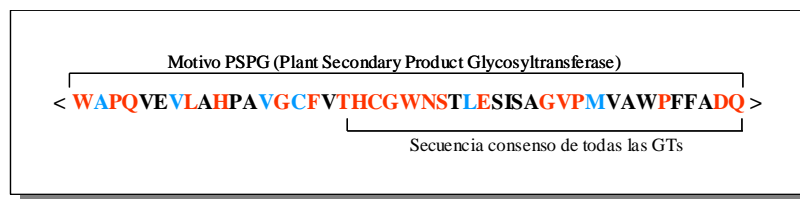


Figura 5. Secuencia consenso de las glicosiltransferasas (GTs). Los aminoácidos destacados en rojo tienen un porcentaje de conservación >80%, los destacados en azul, >50% y los destacados en negro, <50%. Adaptado de Vogt y Jones, 2000; Gachon *et al.*, 2005.

I.3.2. Implicaciones fisiológicas de la glicosilación

Desde un punto de vista químico, la conjugación a un azúcar puede aumentar la estabilidad y solubilidad de ciertos compuestos (Jones y Vogt, 2001). Tal es el caso de las antocianinas, cuya glicosilación es crucial para la estabilidad del anillo aromático. Concretamente, el patrón de glicosilación de antocianinas o flavonoides afecta al color de flores y frutos (Kroon *et al.*, 1994; Brugliera *et al.*, 1999; Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2003). Las GTs también aumentan la estabilidad de compuestos fenólicos y terpenos volátiles, asociados con el sabor de los frutos (Frydman *et al.*, 2004; Kita *et al.*, 2000).

Por otra parte, las GTs intervienen en la compartimentación y almacenamiento de metabolitos (Bowles *et al.*, 2005). Se han descrito numerosos compuestos que, al glicosilarse, son acumulados en las vacuolas (Werner y Matile, 1985; Taguchi *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2005). Esta es una de las razones por las que las GTs son responsables de la inactivación y detoxificación de ciertos compuestos xenobióticos. Algunas sustancias cianogénicas, como la linamarina, permanecen inactivas, al estar glicosiladas, en la vacuola. Cuando la planta es invadida por algún insecto, comienza la degradación celular y, como consecuencia, la liberación del glicósido de la linamarina al medio. A continuación, las β -glicosidasas actúan sobre el conjugado, dando lugar al compuesto cianogénico activo frente al insecto (Vetter, 2000). También se ha visto que determinados compuestos xenobióticos, como ciertas anilinas o triclorofenoles, pierden su toxicidad al ser conjugados a un azúcar (Messner *et al.*, 2003).

La glicosilación juega también un papel importante en la regulación de los niveles activos de algunas hormonas, como auxinas, citoquininas o ácido abscísico. Dependiendo de la posición del azúcar en la molécula, los conjugados pueden actuar como productos catabólicos finales inactivos, o bien como formas transitorias de almacenamiento, que podrían movilizarse tras la activación de ciertas β -glucosidasas (Xu *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2004).

Sin embargo, la conjugación no es sólo un mecanismo de inactivación. Se ha comprobado que para algunos compuestos es necesario unirse a una molécula de azúcar con el fin de ejercer su función. Por ejemplo, la glicosilación de las saponinas de avena para adquirir su propiedad antifúngica (Armah *et al.*, 1999). También se ha comprobado que el glucósido del resveratrol tiene mayor actividad antimicrobiana que el propio aglicón resveratrol (Schulze *et al.*, 2005). Todas estas funciones enlazan con otro de los papeles fisiológicos relevantes de las GTs: su implicación en la respuesta defensiva de la planta.

I.3.3. La glicosilación en la respuesta defensiva

Como se ha enunciado anteriormente, el SA juega un papel fundamental en la señalización de la respuesta defensiva de las plantas. Hace algunos años, diferentes estudios constataron que el SA acumulado en la planta, tras su aplicación exógena o como consecuencia de una infección incompatible, es rápidamente glicoconjugado y acumulado en vacuola (Métraux *et al.*, 1990; Malamy *et al.*, 1992; Enyedi *et al.*, 1992; Edwards, 1994; Lee y Raskin, 1998). Una de las cuestiones que cabía resolver era si el conjugado del SA actuaba o no como molécula activa en el establecimiento de la respuesta defensiva de la planta. En un inicio se pensó que sí, puesto que al infiltrar hojas de tabaco con 2-O- β -glucósido de SA, se observaba una clara inducción de PR1 (Hennig *et al.*, 1993). Sin embargo, pronto se tuvo conocimiento de que el conjugado infiltrado era rápidamente hidrolizado al entrar en la planta, por acción de una β -glucosidasa, y que era el SA libre el verdadero responsable de la inducción de proteínas PR (Chen *et al.*, 1995).

Estos datos conducen a la hipótesis de que la glicosilación del SA podría ser un mecanismo de detoxificación empleado por la planta cuando se ven aumentados sus niveles tras una infección. Una vez conjugado en el citosol, por acción de una glicosiltransferasa, el glucósido del SA pasaría a ser acumulado, inactivo, en la vacuola. Pero esta conjugación no sería irreversible. Cuando la planta precisara el SA libre para activar la respuesta defensiva, el

glicoconjugado saldría de la vacuola para ser hidrolizado por una β -glucosidasa. Por lo tanto, la GT responsable de la glicosilación del SA estaría regulando los niveles activos de esta molécula señal de la respuesta defensiva (Dean *et al.*, 2005).

En 1999, Lee y Raskin clonaron y caracterizaron en tabaco una GT conjugadora de SA. La expresión de esta glicosiltransferasa era inducida tanto por la aplicación exógena de SA, como por infecciones de tipo incompatible causadas por el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) o la bacteria *Pseudomonas*. Pero otras GTs inducibles por SA ya habían sido descritas previamente. Por ejemplo, en tomate se había identificado una posible GT que era inducida por SA y por una interacción tipo incompatible con *Pseudomonas*. Esta proteína, aún sin caracterizar en la actualidad, denominada Twi1, responde además a herida, pero no a JA o ET (O'Donnell *et al.*, 1998).

Por otra parte, en tabaco se había clonado y caracterizado otra GT, homóloga a Twi1, denominada TOGT, inducida por SA, infección con TMV y β -megaspermina (compuesto que desencadena una HR en la planta). Sin embargo, se observó que el SA no era el mejor sustrato para este enzima, sino los ácidos hidroxicinámicos e hidroxicumáricos. Se pensó que la finalidad de estos conjugados podría ser el reforzamiento de la pared celular en el caso de infección o incluso de herida, si TOGT respondiera a este tipo de estrés como su homólogo Twi1 (Whetten y Sederoff, 1995; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998). Posteriormente se han clonado y caracterizado otras GTs inducibles por SA, algunas de ellas conjugadoras de fitoalexinas, como la NTGT de tabaco (Taguchi *et al.*, 2001), la flavonoide-GT de *Scutellaria baicalensis* (Hirotani *et al.*, 2000) o la ya mencionada TOGT, para la que se ha comprobado que presenta una elevada afinidad por el sustrato escopoletina (Chong *et al.*, 1999).

Hace unos años, se crearon líneas anti-sentido de TOGT. Dichas plantas, tras ser inoculadas con TMV, mostraron bajos niveles tanto del enzima como de su sustrato escopoletina y del producto esculetina (conjugado de la escopoletina). Como consecuencia, las plantas anti-sentido resultaban más sensibles frente a patógenos que las plantas control. Además, al disminuir los niveles de escopoletina, un fuerte antioxidante, las plantas transgénicas mostraron un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, TOGT podría ser necesario para la acumulación de escopoletina alrededor del punto de entrada del patógeno, donde ejercería su efecto antiviral como fitoalexina, así como su efecto antioxidante durante la explosión oxidativa característica de los estadios iniciales de la infección patológica (Chong *et al.*, 2002). Del mismo modo, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan

TOGT. Estas plantas resultaron más resistentes a la infección del virus Y de la patata que las plantas control ya que, a pesar de que las áreas necróticas eran de igual tamaño en ambos tipos de plantas, las transgénicas presentaban en dicha necrosis una menor acumulación de la proteína de la cápside viral (Matros y Mock, 2004). Más recientemente, se ha identificado otra GT conjugadora de antocianinas (5-UGT) en patata. La sobreexpresión de esta GT en tubérculo aumenta la resistencia a la bacteria *Erwinia carotovora*, causante de una infección de tipo compatible en la planta (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005). También ha sido identificada una GT de *Arabidopsis thaliana* (DOGT1) implicada en la resistencia a una micotoxina, el desoxinivalenol, producida por *Fusarium*. La sobreexpresión de esta GT aumenta la tolerancia al hongo (Poppenberger *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que mutaciones en las glicosiltransferasas UGT73B3 y UGT73B5 de *Arabidopsis thaliana* provocan en las plantas una menor resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Langlois-Meurinne *et al.*, 2005). Por último, se ha visto que el silenciamiento inducido por virus (VIGS) de una glicosiltransferasa de *Capsicum annuum*, provoca un retraso en la aparición de HR en respuesta a TMV (Lee *et al.*, 2009).

Este tipo de GTs, que parecen estar implicadas en la respuesta defensiva de las plantas, tienen propiedades bioquímicas, estructurales y fisiológicas comunes. Todas ellas presentan una masa molecular de unos 50 KDa, poseen un punto isoeléctrico alrededor de 5 y un pH óptimo en torno a 7. La mayoría muestra una baja especificidad de sustrato en cuanto a la molécula aceptora del azúcar, y una alta especificidad respecto al donante del azúcar, que suele ser la UDPG. Además, todas estas proteínas contienen el motivo PSPG en su extremo C-terminal. Por otra parte, la expresión de este tipo de GTs se induce rápidamente y de forma transitoria por SA, HR y/o herida. La máxima acumulación del mRNA suele darse en torno a las 2-4 h después del tratamiento con SA o herida, mientras que en el caso de una infección de tipo incompatible, el máximo puede retrasarse hasta las 6-8 h. En todos los casos, se ha observado que los niveles de mRNA vuelven a ser los constitutivos a las 24 h.

Por un lado, las GTs regulan los niveles activos de SA, molécula señal implicada en el establecimiento de HR y SAR en la planta infectada. Por otro, regulan los niveles activos de ciertas fitoalexinas y compuestos antioxidantes que intervienen en la defensa de la planta en el momento de la entrada del patógeno y en la subsiguiente explosión oxidativa. Se puede concluir, por tanto, que las GTs tienen un papel fundamental en la respuesta defensiva de la planta, modulando los niveles de algunas de las moléculas que intervienen en dicha respuesta.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Estudios realizados en nuestro laboratorio con diferentes sistemas planta-patógeno que establecen una interacción compatible, no necrotizante, han podido constatar una importante acumulación de ácido gentísico (GA) en plantas infectadas. Los niveles de este compuesto en plantas de tomate superan en gran medida los del ácido salicílico (SA) que, a su vez, es inmediato precursor metabólico del GA. También se ha observado que aplicaciones exógenas de GA desencadenan respuestas defensivas diferentes a las mediadas por SA, por lo que el GA se perfila como una molécula señal complementaria al ácido salicílico en infecciones compatibles (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006).

Las implicaciones de este descubrimiento han abierto nuevas perspectivas en el conocimiento de los mecanismos de señalización patogénica en plantas. En este sentido, resulta de gran interés la obtención de plantas transgénicas con niveles alterados de moléculas implicadas en la respuesta defensiva de la planta, tales como los compuestos fenólicos. Estos compuestos se acumulan en la planta en respuesta a una infección, tanto en su forma libre como glicoconjugada. Dicha reacción de conjugación está catalizada por glicosiltransferasas. La obtención de plantas transgénicas con niveles alterados de estas enzimas supondrá contar con una importante herramienta para ayudar a elucidar el papel de las glicosiltransferasas en la respuesta defensiva de las plantas (Chong *et al.*, 2002; Gachon *et al.*, 2004; Matros y Mock, 2004; Aksamit-Stachurska *et al.*, 2008; Lorenc-Kukula *et al.*, 2009).

El objetivo central del presente Trabajo Final de Máster es la obtención de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de las formas libre y conjugada de GA y/o SA. Así pues, para la obtención de plantas transgénicas se empleará el cDNA de *GAGT*, que codifica una glicosiltransferasa de GA identificada en tomate (Tárraga *et al.*, 2010), y el cDNA de *Twil*, que codifica una proteína de tomate inducida por herida, que también responde a infecciones incompatibles, tratamientos con SA y otros fenólicos y que ha sido propuesta como posible glicosiltransferasa (O'Donnell *et al.*, 1998). Estas plantas podrán ser utilizadas en el futuro para llevar a cabo estudios con patógenos que desarrollen infecciones, tanto de tipo compatible como incompatible, y ayudar a esclarecer el papel de las mencionadas moléculas señal en la interacción planta-patógeno.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo son:

- I. Obtener construcciones génicas en un sistema binario de *Agrobacterium tumefaciens* que permitan la sobreexpresión de *GAGT* y *Twil* en plantas.
- II. Comprobar la actividad *in vivo* de *GAGT* y *Twil* mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.
- III. Transformar genéticamente plantas de tomate con las construcciones binarias anteriormente descritas.

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En la realización del presente trabajo se han empleado plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Moneymaker para la obtención de plantas transgénicas, así como plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), para llevar a cabo experimentos de expresión transitoria.

Todas las plantas empleadas fueron cultivadas en invernadero a una temperatura que oscilaba entre los 25 y los 30 °C, con una humedad relativa entre el 50 y el 70% y con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Para su cultivo se prepararon semilleros en vermiculita y, aproximadamente una semana después de la siembra, las plantas se trasplantaron a macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior) que contenían turba y vermiculita al 50%. Se trasplantó una planta por maceta. Las plantas se sometieron a riego a manta automatizado dos veces al día en solución de Hoagland, tal y como se describe en Naranjo *et al.* (2003).

La toma de muestras del material vegetal se realizó recogiendo aproximadamente 0.5 g de hoja por planta. El material se recogió sobre nitrógeno líquido y se congeló inmediatamente a - 80 °C, hasta el momento de realizar los distintos ensayos.

III.2. Plásmidos y cepas bacterianas

Los plásmidos utilizados para la realización del presente trabajo son, por una parte, el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), que presenta como factor de selección la resistencia a espectinomicina, y por otra, los plásmidos destino pGWB8 y pGWB9 (Nakagawa *et al.*, 2007). Ambos vectores contienen el promotor constitutivo 35S de CaMV y una cola de 6 histidinas (6xHis), que queda fusionada a la proteína en su extremo C-terminal o N-terminal, respectivamente. Tienen como factor de selección la resistencia a kanamicina y se trata de vectores binarios. Asimismo, para efectuar los experimentos de expresión transitoria se utilizó el plásmido p19 (cedido amablemente por el Dr. Diego Orzáez, IBMCP), que codifica la proteína p19 supresora del silenciamiento.

Las cepas bacterianas empleadas fueron: quimiocompetentes de *Escherichia coli* One Shot TOP10 (Invitrogen), para manipulaciones rutinarias de DNA; *E. coli* DB3.1 (Invitrogen), para la propagación de los vectores destino que contienen el gen *ccdB*, resistente a los efectos de la proteína CcdB; *Agrobacterium tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 (Invitrogen), para la transformación de tomate, y, por último, *A. tumefaciens* C58, para agroinfiltrar *N. benthamiana*.

III.3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

III.3.1. Purificación de plásmidos bacterianos

Para la extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (*mini-preps*) se siguió el procedimiento de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). Alternativamente, se empleó el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), en el caso de que las muestras fueran destinadas a secuenciación.

III.3.2. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

Las digestiones de plásmidos con enzimas de restricción se realizaron atendiendo a las recomendaciones de los respectivos proveedores. Los enzimas de restricción empleados fueron: *EcoR* I y *Hind* III (Fermentas). Se digirió 1 µg de DNA en presencia de 10 U de enzima, empleando el tampón específico para cada endonucleasa, en un volumen final de 30 µL, incubándolo durante 2-3 horas a 37 °C.

III.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% como se describe a continuación. Después de dispersar 1 g de agarosa de baja electroendoósmosis (Pronadisa) en 100 mL de tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) se hirvió en microondas y se añadieron 25 µg de bromuro de etidio por cada 50 mL; se vertió la solución en el molde y se dejó gelificar. Una vez obtenido el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis, se rellenó ésta con un volumen suficiente de tampón TAE 1X y se procedió a cargar las muestras de DNA, a las que previamente se les había añadido 1/6 volúmenes de tampón de carga (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.2%). Como patrón de la longitud en pares de bases de las secuencias de DNA, se utilizó el marcador Lambda DNA/*EcoR* I+*Hind* III (Fermentas). La electroforesis se desarrolló a 80-100 V, dependiendo del tamaño del gel, durante el tiempo necesario para el avance de las muestras. Una vez finalizada la separación, tras haber recorrido el colorante unas $\frac{3}{4}$ partes del gel, se visualizó el DNA por exposición a luz UV y se fotografió.

III.3.4. Técnicas de clonaje

Para la obtención de las construcciones correspondientes a las distintas proteínas de fusión que se emplean en este Trabajo, se utilizó el sistema Gateway de Invitrogen. Éste se basa en el proceso de recombinación homóloga del fago lambda para facilitar la transferencia, entre distintos vectores, de secuencias de DNA heterólogo flanqueadas por sitios *att* modificados.

Concretamente, se utilizó la reacción LR catalizada por el enzima LR Clonase, que facilita la recombinación de un sustrato *attL* (clon de entrada), con un sustrato *attR* (vector de destino), para crear un clon de expresión conteniendo sitios *attB* (Figura 6).

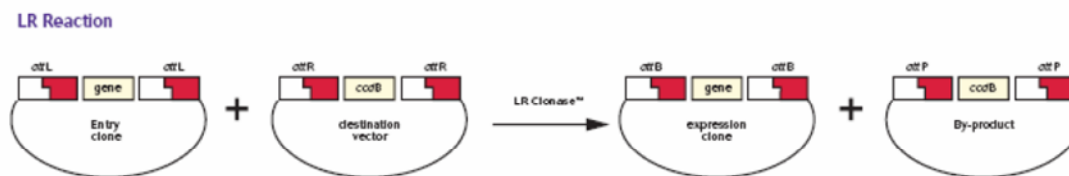


Figura 6. Esquema de la reacción LR del sistema Gateway (Invitrogen).

En primer lugar, se realizó una amplificación mediante PCR, en un volumen final de 50 μ L, de las secuencias a insertar. La mezcla de reacción estaba compuesta por 5 μ L de Ex Taq Buffer, 4 μ L de dNTPs (2.5 mM), 2 μ L de cada uno de los cebadores directo y reverso (1 μ g/ μ L), 2 μ L de TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa), y, como molde, 5 μ L de cDNA obtenido por retrotranscripción (apartado III.3.7) de mRNA de hojas de tomate embebidas en SA o infectadas con CEVd. En cuanto al enzima empleado, se trata de una DNA polimerasa de alta fidelidad que presenta la particularidad de añadir un nucleótido extra de adenina en ambos extremos, 5' y 3', del cDNA que se está copiando, y que resulta imprescindible para el siguiente paso del clonaje. Los cebadores específicos empleados para amplificar el cDNA correspondiente a la glicosiltransferasa de ácido gentísico (GAGT) fueron: directo (5'-ATGACTACTACAAAGCTCATTGC-3') y reverso (5'-GGAAATAGTAACCAACTTGG-3') (Tárraga *et al.*, 2010). Los utilizados para amplificar el cDNA de la proteína de tomate inducida por herida (*Tw1*) fueron: directo (5'-ATGGGTCAGCTACATTTTTTC-3') y reverso (5'-TTAACGATATGAAGTTATGTC-3'). En cuanto a las condiciones de PCR, ésta consistió en una etapa inicial de desnaturalización de 10 min a 94 °C, seguida de 33 ciclos de amplificación compuestos por una primera etapa de desnaturalización de 30 s a 94 °C, una segunda etapa de hibridación de 45 s a 55 °C, y una tercera etapa de extensión de 1.5 min a 72 °C. Tras el último ciclo se finalizó la reacción con una etapa de extensión de 5 min a 72 °C.

A continuación, el fragmento amplificado fue clonado en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), generándose así lo que se denomina un clon de entrada. La reacción se llevó a cabo incubando 4 μ L del producto de PCR con 1 μ L del vector TOPO y 1 μ L de solución salina (NaCl 1.2 M y MgCl₂ 0.06 M), debido a que las células a transformar son *E. coli* químicamente competentes. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la reacción se mantuvo en hielo hasta el momento de la transformación bacteriana. Alternativamente, ésta puede almacenarse a -20 °C.

Una vez obtenido el clon de entrada, se procedió a la reacción de recombinación LR para transferir el inserto del vector de entrada al vector destino. Para producir la reacción LR entre los vectores TOPO recombinantes, portadores de los diferentes cDNAs, y los vectores destino, se realizaron las siguientes mezclas de reacción: 3 μ L de vector TOPO (GAGT o Twi1) en TE (50 ng/ μ L), 3 μ L del vector destino (pGWB8 o pGWB9) en tampón TE (50 ng/ μ L), 2 μ L de 5X LR Clonase Reaction Buffer y 2 μ L del enzima LR Clonase. Las distintas mezclas de reacción se incubaron toda la noche a 25 °C, y posteriormente se añadió 1 μ L de Proteinasa K (2 μ g/ μ L) para terminar la reacción. Finalmente, las muestras se incubaron 10 min a 37 °C.

III.3.5. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de las células competentes *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen) se llevó a cabo, según el protocolo del fabricante, como se describe a continuación. Se mezclaron 10 μ L de cada una de las recombinaciones Gateway con 50 μ L de una suspensión concentrada de células TOP10. Las mezclas se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación se sometieron a un choque térmico de 30 s a 42 °C y se pasaron a hielo durante 2 min. Seguidamente se añadió 1 mL de medio LB (1% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura bacteriológico y 1% de NaCl) para su incubación durante 1 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las mezclas de transformación se centrifugaron 5 min a 8000 rpm. Los precipitados celulares fueron resuspendidos en 100 μ L y se sembraron en medio LB-agar, conteniendo el antibiótico de selección adecuado (espectinomicina a 50 μ g/ μ L o kanamicina a 50 μ g/ μ L). Las distintas placas se incubaron toda la noche a 37 °C para permitir el crecimiento de colonias transformantes.

III.3.6. Extracción de RNA total de plantas

La extracción de RNA de diferentes tejidos de la planta se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol (Gibco BRL Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la degradación del RNA, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso y las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. En los análisis de transcripción reversa se utilizaron 5 μ g de RNA total, cuantificado por A_{260} . Para ello se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000.

III.3.7. Reacciones de amplificación (RT-PCR)

Se empleó transcripción reversa acoplada a amplificación específica de secuencias (RT-PCR) para comprobar la actividad de los genes agroinoculados en los experimentos de expresión transitoria. Para ello, se partió de 5 μ g de RNA total en un volumen final de reacción de 50 μ L. Se añadieron 2 μ g del oligonucleótido dT₁₈, 10 μ L de tampón de reacción 5X y agua

tratada con DEPC hasta un volumen de 44 μ L. La solución se mantuvo durante 10 min a 65 °C para desnaturalizar los ácidos nucleicos, pasando inmediatamente después los tubos a hielo otros 10 min. A continuación, se añadió una mezcla equimolar de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a una concentración de 2.5 mM cada uno y 200 unidades (1 μ L) del enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega). Después de agitar, se incubó la solución a 42 °C durante 1 hora y posteriormente se inactivó el enzima mediante incubación a 70 °C durante 10 min. La reacción se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L, empleando en cada reacción 5 μ L de la reacción de RT, 1 μ L de cada cebador, 5 μ L de dNTPs 2.5 mM, 5 μ L de tampón de reacción 10X y 2 unidades de DNA polimerasa (Netzyme, NEED). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 min de desnaturalización a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de apareamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C, terminando con un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Se utilizó para ello un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Los cebadores específicos empleados para amplificar el mRNA correspondiente a *GAGT* unido a una cola de histidinas en el extremo C-terminal fueron: directo (5'-ATGACTACTCACAAGCTCATTGC-3') y reverso (5'-ATGATGATGATGATGATG-3'). Los utilizados para amplificar el mensajero que corresponde a *Twil* con una cola de histidinas en el extremo N-terminal fueron: directo (5'-CATCATCATCATCATCAT-3') y reverso (5'-TTAACGATATGAAGTTATGTC-3'). Por último, los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del cDNA del gen de la proteína ribosomal L2 (*RPL2*, Fleming *et al.*, 1993) fueron los siguientes: directo (5'-GGTGACCGTGGTGTCTTTGC-3') y reverso (5'-ACCAACCTTTTGTCCAGGAGGT-3').

III.3.8. Secuenciación de DNA

La secuenciación de los diferentes clones se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del IBMCP, utilizando didesoxinucleótidos (terminadores) marcados con compuestos fluorescentes (Prober *et al.*, 1987). Los productos marcados se resolvieron en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Los datos proporcionados por el secuenciador se refinaron mediante el programa CHROMAS (<http://www.technelysium.com.au>) para la resolución de posibles indeterminaciones.

III.3.9. Recursos informáticos

Se empleó el algoritmo BLAST para rastrear las bases de datos EMBL/GenBank, a través de los formularios *en línea* que se encuentran en la URL del National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el diseño de los cebadores específicos de las diferentes secuencias estudiadas se utilizó el servicio Primer3 (biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

Los análisis de secuencia se realizaron empleando la aplicación MegAlign de la *suite* informática DNASTar Lasergene. Para destacar las zonas homólogas de los alineamientos producidos por MegAlign se utilizó el programa GENEDOC (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc>).

III.4. Extracción y detección de proteínas recombinantes

III.4.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

La separación electroforética de proteínas para la identificación de GAGT y Twi1 expresadas en hojas de *N. benthamiana* se realizó según el sistema discontinuo descrito por Conejero y Semancik (1977) empleando geles de poliacrilamida al 14%. Típicamente, el material de partida era medio tubo Eppendorf de tejido foliar congelado a - 80°C. El tejido se homogeneizó con ayuda de una varilla de punta cónica en 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 15 mM. Tras centrifugar durante 10 min a 12.000 rpm y 4 °C, se tomaron 300 µL del sobrenadante a los que se añadieron 150 µL de tampón de carga de electroforesis 3X y 20 µL de mercaptoetanol. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min para provocar la desnaturalización de las proteínas, y se aplicaron 50 µL de muestra por pocillo. Se cargó, además, un marcador de peso molecular (PageRuler, Fermentas) para la posterior identificación de las bandas proteicas. La electroforesis se llevó a cabo a 30 mA durante 2-3 horas en tampón TrisHCl 25 mM, glicina 250 mM y SDS al 0.1%.

Finalizado el proceso, los geles se tiñeron con una solución colorante (Azul Coomassie 0.05%, en ácido acético 10% e isopropanol 20%) durante varias horas y se destiñó con solución decolorante (ácido acético 10%, isopropanol 10%), manteniendo en agitación durante varias horas hasta eliminar la tinción de fondo.

III.4.2. Western blot

Para llevar a cabo la transferencia de las proteínas separadas previamente por SDS-PAGE a filtros de nitrocelulosa (OPTITRAN, Schleicher & Schuell), se siguió una variante “semi-seca” del método de Towbin *et al.* (1979). Para ello, tanto el papel Whatman como los geles de

poliacrilamida y los filtros de nitrocelulosa se humedecieron previamente en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 186 mM, SDS 0.02% y metanol al 20%). El montaje se realizó de forma sumergida, procurando evitar la formación de burbujas. La transferencia se llevó a cabo en el seno del mismo tampón, a temperatura ambiente, haciendo uso de una célula de electrotransferencia (Hoefer Semiphor), y aplicando el miliamperaje especificado en las instrucciones del fabricante ($i \text{ (mA)} = 0.8 \times \text{área del gel en cm}^2$) durante 1.5 h. Las proteínas transferidas a nitrocelulosa se tiñeron de manera reversible con una solución de Ponceau S (Sigma) al 0.1% en 5% de ácido acético durante 1-2 min a temperatura ambiente. Para desteñir las proteínas se realizaron 2 lavados con tampón de transferencia.

Los centros de unión libres de las membranas de nitrocelulosa se saturaron mediante incubación con una solución bloqueante (TBS 1X, Tween 20 al 0.05% y 5% de leche en polvo desnatada) durante toda la noche a 4 °C en agitación suave.

III.4.3. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana

Para llevar a cabo la detección inmunológica de las proteínas, en primer lugar se incubó la membrana durante 1 h en agitación suave con una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal Anti-His (Novagen) en TBS-L (TBS 1X y 5% de leche en polvo desnatada). Dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente las proteínas GAGT y Twi1 recombinantes, debido a la cola de 6 histidinas que presentan en sus extremos C-t y N-t, respectivamente. A continuación se realizaron 4 lavados de 10 min con TBS y se procedió a la incubación de la membrana con una dilución 1:7500 del anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG (H+L) (Promega) conjugado a fosfatasa alcalina, en TBS-L durante 1 h y agitación suave. Tras 4 lavados de 10 min con TBS, la membrana se equilibró durante unos minutos en tampón de fosfatasa alcalina (Tris 1 M, pH 8.0, NaCl 5 M y Cl_2Mg 1 M, a un pH final de 9.0 (NaOH)) y, seguidamente se procedió a la visualización del anticuerpo empleando NBT (nitroblue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) como sustratos de la fosfatasa alcalina.

III.5. Extracción de compuestos fenólicos

III.5.1. Compuestos fenólicos libres

Cada muestra de tejido foliar (0.5 g) se trituró en un mortero con nitrógeno líquido, para facilitar su homogeneización, añadiendo 1.5 mL de metanol. Al mismo tiempo, se adicionó 100 μL de una disolución de ácido anísico 0.0625 mM (disuelto en metanol) como patrón interno de la extracción. A continuación, la muestra se trasvasó a tubos Eppendorf de 2 mL y se sometió a ultrasonidos durante 10 min para terminar de romper las células, facilitando así la extracción.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio de 4 mL. Las muestras se secaron en corriente de nitrógeno seco a temperatura ambiente. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 1 mL de ácido perclórico al 5% y a continuación se añadió 2.5 mL de una mezcla de acetato de etilo y ciclopentano (1:1, v/v), formándose dos fases inmiscibles; los compuestos fenólicos de interés se encuentran en la fase orgánica superior, que se recogió y se secó con corriente de N₂ seco en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las muestras secas se resuspendieron en 300 µL de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL a la que se le acopló un filtro de nylon de 13 mm y 0.45 µm de poro (Waters). Se procedió a otro secado y se resuspendió la muestra en un volumen final de 200 µL de metanol. De este modo, las muestras quedaron preparadas para el análisis por HPLC.

III.5.2. Compuestos fenólicos conjugados

El contenido en compuestos fenólicos glicosilados se determinó tras ser liberados del azúcar por hidrólisis enzimática. Se empleó β-glucosidasa para detectar la presencia de compuestos fenólicos conjugados en forma de β-glucósidos.

Las extracciones se realizaron del mismo modo que en el apartado anterior hasta el momento del primer secado de las muestras en corriente de nitrógeno seco. A continuación se añadió 1 mL de tampón acetato sódico (0.1 M, pH 4.5) con el enzima β-glucosidasa (Fluka) preparado a una concentración de 10 mg/mL. La mezcla se dejó a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se adicionaron 77 µL de ácido perclórico (70% v/v) para alcanzar una concentración final del 5%. Entonces, se realizó una extracción líquido-líquido con ciclopentano/acetato de etilo (1:1, v/v) y se procedió del mismo modo que en el caso de la extracción de compuestos fenólicos libres.

III.6. Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis por HPLC de los extractos de hojas se hicieron siguiendo los protocolos descritos en Yalpani *et al.* (1993) y Bellés *et al.* (1999). De los 200 µL del extracto metanólico final se inyectaron directamente 20 µL en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 µm, 4.6 x 150 mm; Waters, Mildford, MA) equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker). Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100%) durante 20 min, con un flujo constante de 1 mL/min. El SA, GA y ácido anísico (ANI) se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm. Para su cuantificación se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida (ANEXOS, Figura A1). A su vez, se obtuvieron dos rectas que mostraban la relación existente entre las lecturas

correspondientes al ANI y al GA y entre el ANI y el SA (ANEXOS, Figura A2 y Figura A3). Como se observa, ambas relaciones son lineales en los márgenes de concentración en que se está trabajando.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante una prueba t para diferencia de medias de muestras independientes, utilizando el programa estadístico SPSS v. 17.

III.7. Experimentos de expresión transitoria y tratamientos

El análisis funcional de la actividad del cDNA de los genes *GAGT* y *Twi1* en planta se realizó mediante experimentos de expresión transitoria por agroinfiltración en tabaco, siguiendo el método descrito en Yang *et al.* (2000). Para ello, se introdujeron las construcciones pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1* así como los vectores pGWB8, pGWB9 y p19 en la cepa C58 de *A. tumefaciens*. Se creció un inóculo de 50 mL a 28 °C durante toda una noche. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en el medio de inducción (MES 10 mM a pH 5.6; MgCl₂ 10 mM y 150 µM de acetosiringona) llevándolas a una densidad óptica A₆₀₀ de 0.5. Finalmente, la suspensión de células se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 ó 3 horas y se infiltró con una jeringa sin aguja en las 4 primeras hojas de plantas de tabaco de aproximadamente un mes de edad. Transcurridos tres días desde la inoculación se procedió a la recogida de muestras del material agroinfiltrado de cada planta, para llevar a cabo los ensayos correspondientes.

Los tratamientos con ácido salicílico (SA) y ácido gentísico (GA) de las plantas de tabaco agroinfiltradas se realizaron cortando y embebiendo el tallo en disoluciones acuosas de SA y GA, preparadas a 1 mM y 2 mM, respectivamente. El tratamiento se realizó a los dos días de la infiltración con *Agrobacterium*. Pasadas 24 horas en el caso del SA y de 4 horas para el GA, estas disoluciones fueron reemplazadas por agua. La toma de muestras tuvo lugar al día siguiente. En la Figura 7 se muestra un diagrama temporal del proceso experimental.

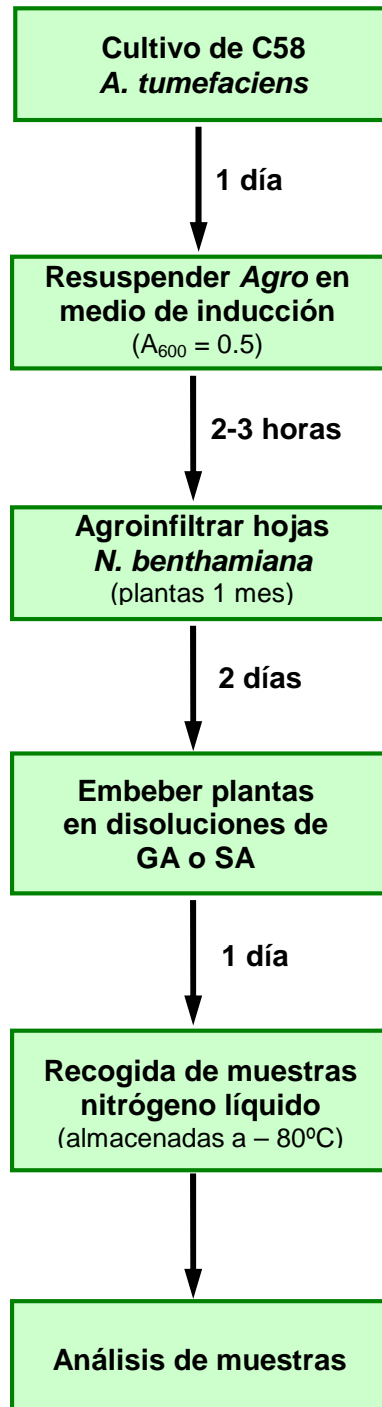


Figura 7. Diagrama temporal de expresión transitoria y tratamientos exógenos con GA o SA.

III.8. Obtención de plantas transgénicas

III.8.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* de las cepas C58 se llevó a cabo mediante choque térmico, siguiendo el método descrito por Bevan (1984). En cuanto a las células de *A. tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 de Invitrogen, se transformaron según las instrucciones del fabricante, mediante un electroporador Eppendorf 2510, aplicando 2.0 kV, 25 μ F y 200 Ohm.

III.8.2. Transformación de plantas de tomate

La transformación genética de tomate cultivar Moneymaker con la construcción *pGWB8_GAGT* se llevó a cabo mediante cocultivo de explantes de cotiledones en *A. tumefaciens* LBA4404, según el método desarrollado por Ellul *et al.* (2003). En la Figura 8 se muestra de forma esquemática los pasos a seguir para la transformación.

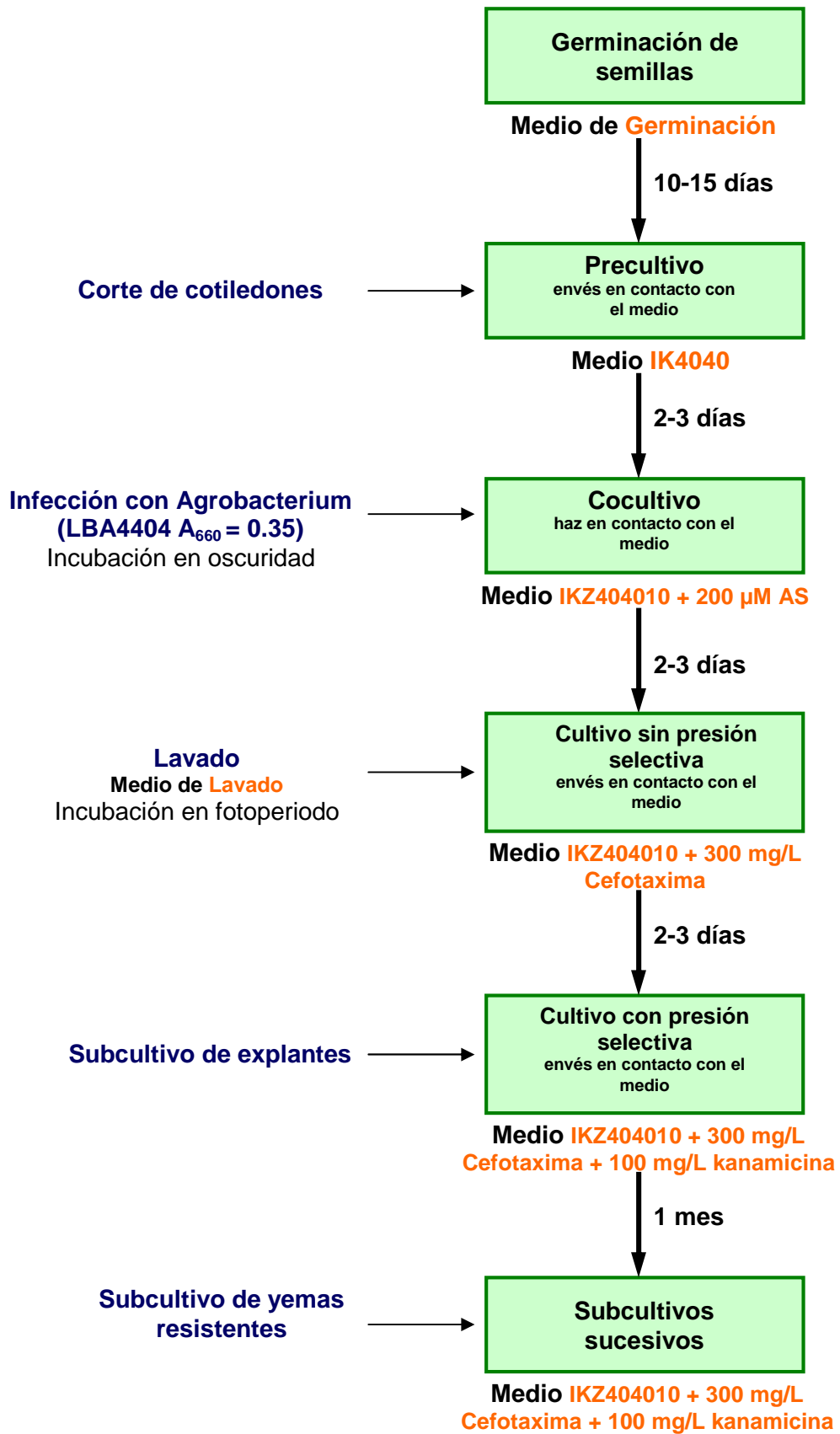


Figura 8. Diagrama temporal de la transformación de tomate.

IV. Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de contribuir a esclarecer el papel señalizador del ácido gentísico (GA) en la respuesta defensiva de las plantas, se pretende obtener plantas transgénicas de tomate que presenten niveles alterados de dicho metabolito, tanto en su forma libre como conjugada. Ello puede conseguirse mediante la sobreexpresión de la glicosiltransferasa conjugadora de GA en tomate (GAGT) caracterizada en nuestro grupo (Tárraga *et al.*, 2010). Debido a la alteración en los niveles libres y conjugados de GA, dichas plantas transgénicas deberían mostrar una susceptibilidad diferente ante una infección de tipo compatible, es decir, ante una infección donde la acumulación de GA ha sido previamente descrita (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006).

Por otra parte, en el presente trabajo se pretende llevar a cabo la caracterización de la actividad de la proteína de tomate inducida por herida (Twi1). Dicha proteína, que fue identificada como posible glicosiltransferasa debido a su homología de secuencia con proteínas pertenecientes a esta clase, se induce en tomate en respuesta a herida, interacciones de tipo incompatible y compuestos fenólicos tales como el ácido salicílico (SA) (O'Donnell *et al.*, 1998). Así pues, las funciones de ambas glicosiltransferasas pueden estar relacionadas y, por tanto, la caracterización de la actividad de Twi1 puede resultar de gran interés en el estudio de la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente a ataques patogénicos.

Para ello, se obtendrá en primer lugar una construcción binaria para sobreexpresar el cDNA completo, tanto de *GAGT* como de *Twi1*, en plantas. A continuación, se comprobará dicha construcción mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*, y se llevarán a cabo diferentes ensayos de actividad *in vivo*. Por último, y en el caso de observar actividad por parte de la proteína recombinante, se procederá a la transformación genética de plantas de tomate con las construcciones binarias descritas.

IV.1. Amplificación y clonación del cDNA de GAGT y Twi1

En primer lugar se amplificaron los cDNAs completos de los genes *GAGT* y *Twi1* de tomate con oligos específicos, tal y como se detalla en Materiales y Métodos (apartado III.3.4.). Haciendo uso de la tecnología Gateway (Invitrogen), se obtuvieron los clones de entrada pCR8/GW/TOPO_*GAGT* y pCR8/GW/TOPO_*Twi1*. La comprobación de que ambos cDNAs se habían insertado en el plásmido se realizó mediante digestión con el enzima *EcoR* I, que libera el inserto completo. En ambos casos se obtuvo una banda de aproximadamente 1.4 kb, correspondiente al cDNA de *GAGT* (1375 pb) o *Twi1* (1401 pb), y otra de 2.8 kb, correspondiente al vector pCR8/GW/TOPO. Dichos clones fueron secuenciados para comprobar la integridad de los insertos, así como la ausencia de mutaciones puntuales.

A continuación y mediante la reacción de recombinación LR, se generaron los clones de expresión pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1*, que expresarán, bajo el control del promotor constitutivo 35S de CaMV, la proteína recombinante *GAGT* con cola de histidinas fusionada en pauta de lectura en el extremo C-t y la proteína recombinante *Twi1* con cola de histidinas en el extremo N-t. En la Figura 9 se muestra el esquema de estas construcciones, pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1*. La comprobación de que el cDNA se había insertado en el plásmido en orientación directa, se realizó mediante una digestión con el enzima *Hind* III. Un sitio de restricción para este enzima se encuentra en ambos plásmidos destino, previo a la secuencia nucleotídica correspondiente al promotor 35S. El otro se encuentra en la secuencia de cDNA de ambos genes. En el caso de *GAGT*, dicho sitio de restricción se localiza en la posición 1136, por lo que la digestión liberará una banda de aproximadamente 2 kb. Para *Twi1*, el sitio de corte se localiza en la posición 74, por tanto, tras digerir con *Hind* III se obtiene una banda de alrededor de 1 kb. En ambos casos se obtiene también una banda cercana a 17 kb, que es el tamaño medio de los plásmidos destino pGWB. La Figura 9 muestra el resultado de esta comprobación, donde se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde aparecen los plásmidos pGWB8 y pGWB9 digeridos con el enzima de restricción *Hind* III y las bandas liberadas tras la digestión de las construcciones pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1* con *Hind* III.

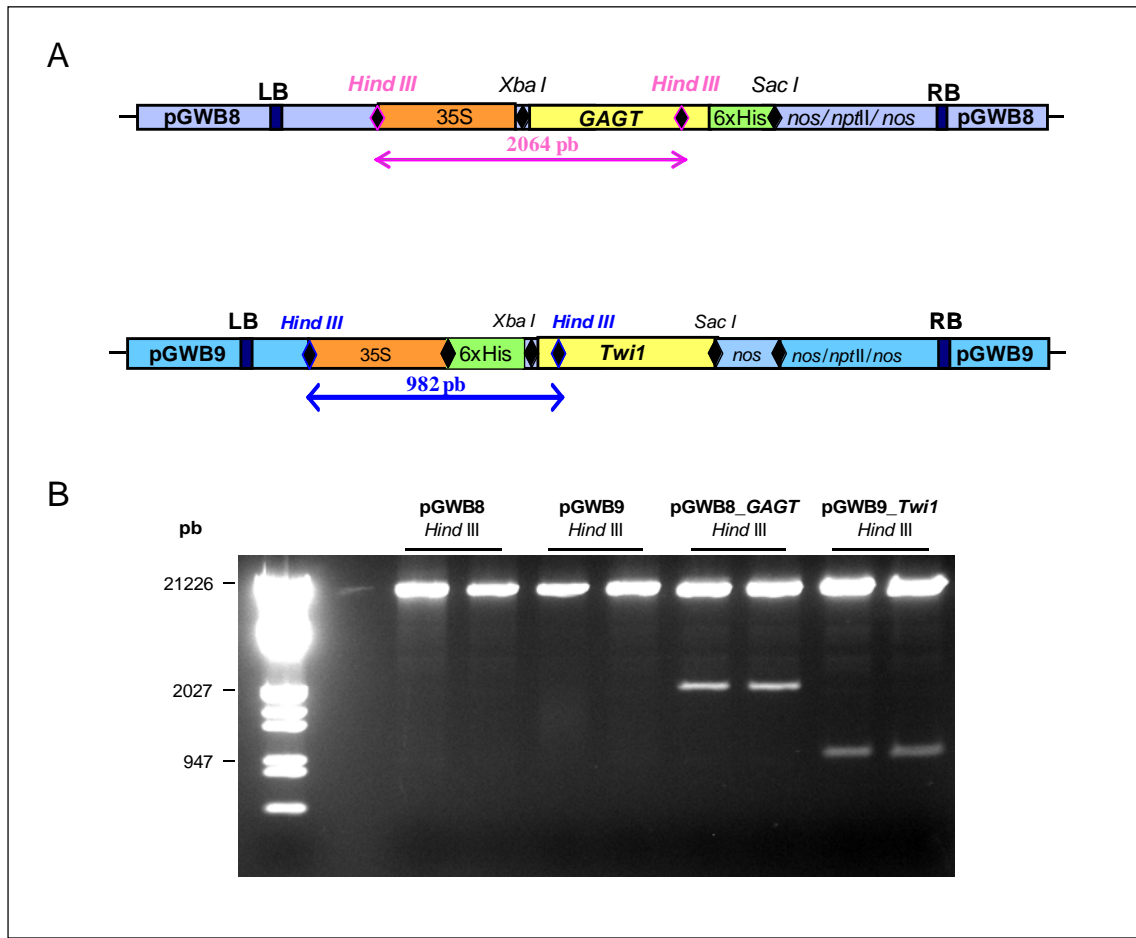


Figura 9. Obtención de los clones de expresión para GAGT y Twi1. A) Construcción de pGWB8_GAGT y pGWB9_Twi1. El promotor 35S dirige la expresión del cDNA de los genes *GAGT* y *Twi1*. Se señala la longitud de los distintos *cassettes*. LB: borde izquierdo del plásmido binario; RB: borde derecho del plásmido binario. B) Comprobación de la correcta inserción del cDNA de *GAGT* y *Twi1* en pGWB8 y pGWB9, respectivamente. Las construcciones pGWB8_GAGT y pGWB9_Twi1 fueron digeridas con el enzima *Hind* III y los productos resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. pGWB8 *Hind* III: producto de la digestión del vector pGWB8 con enzima *Hind* III. pGWB9 *Hind* III: producto de la digestión del vector pGWB9 con enzima *Hind* III. pGWB8_GAGT *Hind* III: productos de la digestión del vector pGWB8_GAGT con enzima *Hind* III. pGWB9_Twi1: productos de la digestión del vector pGWB9_Twi1 con enzima *Hind* III.

Con los plásmidos binarios anteriores, portadores de ambas construcciones (pGWB8_GAGT y pGWB9_Twi1), se transformaron bacterias de la cepas C58 y ElectroMAX LBA4404 (Invitrogen) de *Agrobacterium tumefaciens*, siguiendo los pasos descritos en Materiales y Métodos. Para comprobar la transformación, se llevó a cabo el rescate de los plásmidos en *Escherichia coli* utilizando el DNA obtenido de las colonias de *A. tumefaciens*. De nuevo, se

llevaron a cabo las digestiones de comprobación antes descritas para los plásmidos obtenidos de las colonias de *E. coli* transformadas.

De este modo, queda disponible un sistema binario de *Agrobacterium tumefaciens* que puede ser utilizado para la sobreexpresión de *GAGT* y *Twi1* en plantas.

IV.2. Estudio de la actividad in vivo de GAGT y Twi1 mediante expresión transitoria en Nicotiana benthamiana

IV.2.1. Experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Tras la obtención de los sistemas binarios del apartado anterior, se procedió a comprobar que las proteínas recombinantes *GAGT* y *Twi1* presentan actividad en plantas. Para ello, se realizó un experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Este sistema fue elegido debido a la sencillez del experimento y su rapidez, ya que este método permite efectuar ensayos reproducibles que pueden ser llevados a cabo en tan sólo 2-3 días (Yang *et al.*, 2000). De esta manera, podríamos comprobar, previamente a realizar la transformación de tomate, si las construcciones obtenidas funcionan en una planta perteneciente a la misma familia, las Solanáceas.

Para poder llevar a cabo el experimento, se partió de bacterias de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con: i) los plásmidos binarios pGWB8 o pGWB9 utilizados como controles, ii) las construcciones pGWB8_*GAGT* o pGWB9_*Twi1* y iii) el plásmido p19, que codifica el supresor viral de silenciamiento del mismo nombre. Esta construcción fue amablemente cedida por el Dr. Diego Orzáez (IBMCP, UPV-CSIC, Valencia, España).

La forma más apropiada de evaluar la actividad *GAGT* o *Twi1*, sería llevar a cabo una infección de las plantas de *N. benthamiana* que produjera la acumulación de ácido gentísico y/o salicílico en las mismas. No obstante, puesto que no se ha descrito la acumulación de GA en plantas de tabaco frente a la infección con TMV (Yalpani *et al.*, 1993; Bellés *et al.*, 1999), se decidió llevar a cabo los ensayos de actividad aportando de manera exógena los sustratos GA o SA sobre las plantas agroinoculadas. Como ya se ha comentado previamente en la introducción, el SA es el precursor inmediato del GA. Por tanto, al tratar exógenamente las plantas con SA, una parte del SA acumulado por la planta se convertiría a GA por la actividad del enzima salicilato-5-hidroxilasa, tal y como se describe en Bellés *et al.* (1999). La forma de realizar los

tratamientos (embebiendo explantes, “*stem-feeding*”), las concentraciones elegidas (SA 1 mM o GA 2 mM), así como los tiempos de tratamiento (4 h para GA y 24 h para SA), se consideraron teniendo en cuenta la experiencia previa obtenida en nuestro laboratorio. Con los tratamientos exógenos de GA y SA se aportaría a las plantas el sustrato para poder así evaluar la actividad de GAGT y Twi1 recombinantes sobre los mismos. En principio, cabría suponer una disminución del GA libre acumulado en plantas de tabaco *GAGT* así como un aumento en los niveles de GA conjugado respecto a las plantas control, todo ello como consecuencia de la actividad GAGT. En cuanto a Twi1, existe una mayor incertidumbre sobre el resultado, puesto que su actividad no ha sido caracterizada. Suponiendo cierta la hipótesis de que Twi1 sea una glicosiltransferasa de SA, se esperaría obtener un resultado similar a GAGT, aunque en este caso el sustrato podría ser el ácido salicílico.

El experimento se realizó en plantas de 4 semanas de edad, utilizando para ello un total de 24 plantas. Doce de ellas, consideradas como controles, fueron infiltradas con una mezcla 1:1 de bacterias de *Agrobacterium* que contenían los plásmidos pGWB8 o pGWB9 y el plásmido p19. Las doce plantas restantes, a las que denominamos plantas *GAGT* o *Twi1*, se infiltraron con una mezcla 1:1 de bacterias de *Agrobacterium* que contenían la construcción pGWB8_*GAGT* o pGWB9_*Twi1* y el plásmido p19. La utilización del plásmido p19 mejora la eficiencia de la sobreexpresión, ya que evita el silenciamiento génico posttranscripcional (Voinnet *et al.*, 2003). Como ya se ha indicado, a los dos días de la agroinfiltración las plantas fueron cortadas y embebidas en soluciones de GA 2 mM o SA 1 mM, durante 4 y 24 horas, respectivamente. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las plantas se pasaron a agua. En ambos casos, las muestras fueron recogidas a los 3 días de haber realizado la agroinoculación, con el fin de llevar a cabo los análisis de actividad, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

IV.2.2. Estudio de la expresión transitoria del cDNA recombinante de *GAGT* y *Twi1* en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Una vez recogido el material vegetal, se procedió al estudio de la expresión del cDNA recombinante de *GAGT* y *Twi1*, formado por el cDNA correspondiente a cada uno de estos genes, fusionado a la secuencia nucleotídica que codifica 6 histidinas, en sus extremos 5' o 3', respectivamente. Para ello, se extrajo RNA total de las muestras y posteriormente se realizó la transcripción reversa para obtener los correspondientes cDNAs, que finalmente fueron amplificados por PCR, utilizando cebadores específicos de *GAGT*, *Twi1* y cola de histidinas,

según se detalla en Materiales y Métodos. Como control se realizaron amplificaciones empleando oligonucleótidos del gen constitutivo *RPL2* (Fleming *et al.*, 1993) (Figura 10).

Los resultados mostraron cómo los cDNAs recombinantes de *GAGT* y *Twi1* se transcribían en todas las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1*, y que todos ellos portaban fusionada, en el extremo correspondiente, la secuencia nucleotídica que codifica 6 histidinas, y que posibilita la detección inmunológica de las proteínas recombinantes con un anticuerpo monoclonal Anti-His.

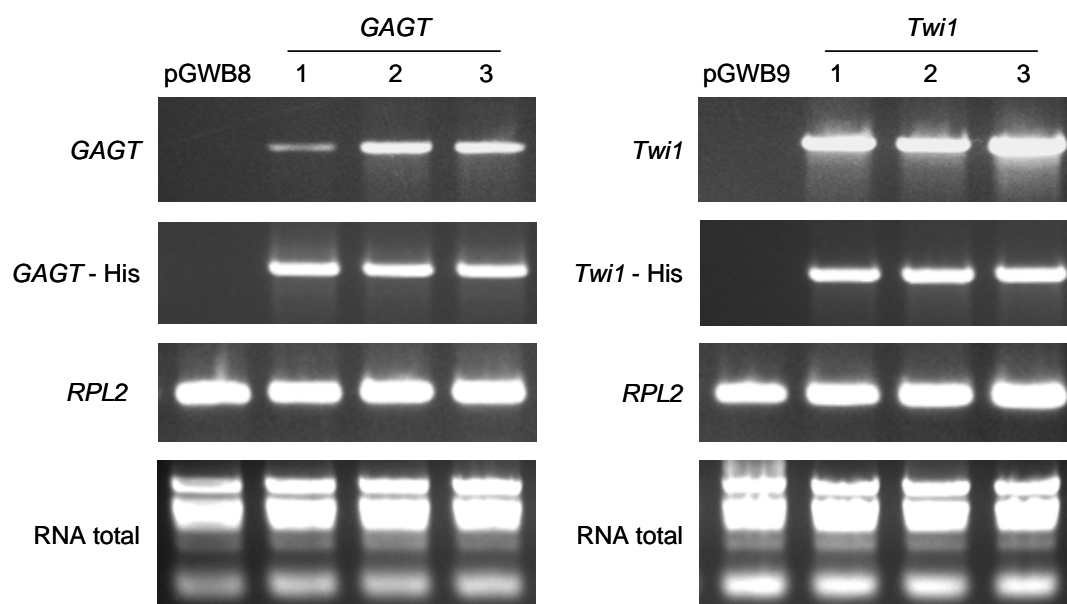


Figura 10. Estudio de la expresión de los cDNAs *GAGT* y *Twi1* recombinantes en plantas de *N. benthamiana*. Se muestra el análisis electroforético del resultado de las RT-PCRs realizadas a partir de RNAs de plantas control pGWB8 y pGWB9, y plantas transgénicas pGWB8_*GAGT* y pGWB9_*Twi1*, portadoras de los cDNAs *GAGT* y *Twi1*, respectivamente. Carreras pGWB8 y pGWB9: plantas de tabaco control; carreras *GAGT* 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB8_*GAGT*; carreras *Twi1* 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB9_*Twi1*. *GAGT* y *Twi1*: PCRs realizadas con cebadores específicos de *GAGT* y *Twi1*. *GAGT*-His y *Twi1*-His: PCRs realizadas con cebadores específicos de *GAGT*, *Twi1* y cola de histidinas (His). *RPL2*: PCRs realizadas con cebadores específicos del gen *RPL2* utilizado como control. Panel inferior: control de carga (RNA total).

IV.2.3. Estudio de la actividad enzimática de GAGT y Twi1 en la expresión transitoria de pGWB8_GAGT y pGWB9_Twi1

Tras comprobar que existía mensajero de *GAGT* y *Twi1* con sus correspondientes extensiones de 6 His en las plantas agroinfiltradas, se procedió a realizar los ensayos de actividad GT presente en los tejidos tratados. Como se ha explicado anteriormente, el sustrato para ambas proteínas se aportó a las plantas agroinfiltradas mediante incubación exógena con GA y SA.

Para poder conocer la cantidad de GA y SA presente en las plantas en los distintos casos, se realizaron extracciones de compuestos fenólicos de cada una de las muestras y se analizaron mediante HPLC. Como se puede apreciar en el cromatograma de la Figura 11, el GA y SA presentan un tiempo de retención de 13.298 minutos y 19.014 minutos, respectivamente, con las condiciones cromatográficas empleadas (Materiales y Métodos). En cuanto al ácido anísico (ANI) empleado como patrón interno de la extracción, éste presenta un tiempo de retención de 14.153 minutos.

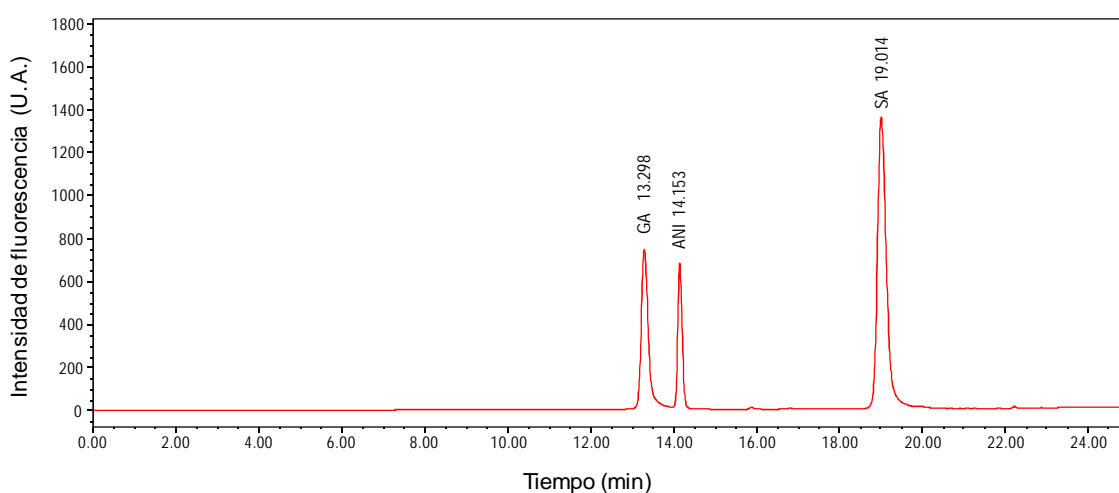


Figura 11. Compuestos fenólicos presentes en extractos de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas y tratadas exógenamente con GA o SA, empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno. Se muestra un cromatograma representativo de los tres compuestos y se detalla el tiempo de retención del GA (13.298 min), ANI (14.153 min) y SA (19.014 min) para las condiciones cromatográficas empleadas.

Normalmente, el GA se encuentra en muy pequeña cantidad en forma libre en la planta, ya que se ha comprobado que éste es rápidamente conjugado a un azúcar (Bellés *et al.*, 1999, 2006) por la acción del enzima tipo glicosiltransferasa GAGT (Tárraga *et al.*, 2010). Lo mismo ocurre con el SA cuando se acumula en infecciones necróticas (Yalpani *et al.*, 1992; Enyedi y Raskin, 1993; Edwards, 1994). Por ello, para conocer los niveles totales de SA o GA acumulados en planta, es necesario analizar los niveles de compuesto tanto en forma libre como en forma conjugada, correspondiendo el total a la suma de ambas formas (Materiales y Métodos).

En la Figura 12 se representan gráficamente los resultados del estudio del contenido de GA libre y total acumulado en plantas agroinoculadas con pGWB8_GAGT / p19 (plantas GAGT) y sus correspondientes controles agroinoculados con pGWB8 / p19 (plantas pGWB8) tras el tratamiento con GA 2 mM. Los datos mostrados corresponden a 3 réplicas biológicas, mientras las barras de error corresponden a 3 réplicas técnicas, es decir, extracciones independientes de la misma muestra. Como cabría esperar, los niveles totales de GA son en todos los casos superiores a los libres, debido a la gran cantidad de compuesto que se encuentra en forma conjugada. Asimismo, se observa que las plantas GAGT presentan mayores niveles de acumulación de GA libre y conjugado que las plantas control, indicando que GAGT presenta actividad *in vivo* frente a GA en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Concretamente, en las plantas control, los niveles medios de GA libre y total son 32.53 nmoles/g de peso fresco y 403.93 nmoles/g de peso fresco, respectivamente. Por otra parte, las plantas GAGT presentan unos valores medios de GA libre y total de 127.31 nmoles/g y 1228.7 nmoles/g de peso fresco, respectivamente. Estos niveles de GA total en plantas GAGT son del orden de los detectados en tomate variedad Rutgers infectado con CEVd, esto es, entre 600 y 3000 nmoles/g de peso fresco (Fayos *et al.*, 2006), lo que implica que los tratamientos efectuados podrían simular en cierta medida las condiciones de una infección sistémica. En suma, las plantas GAGT han mostrado un aumento medio del 74.5% en los niveles de GA libre y del 67% en los niveles de GA total, respecto a las plantas control.

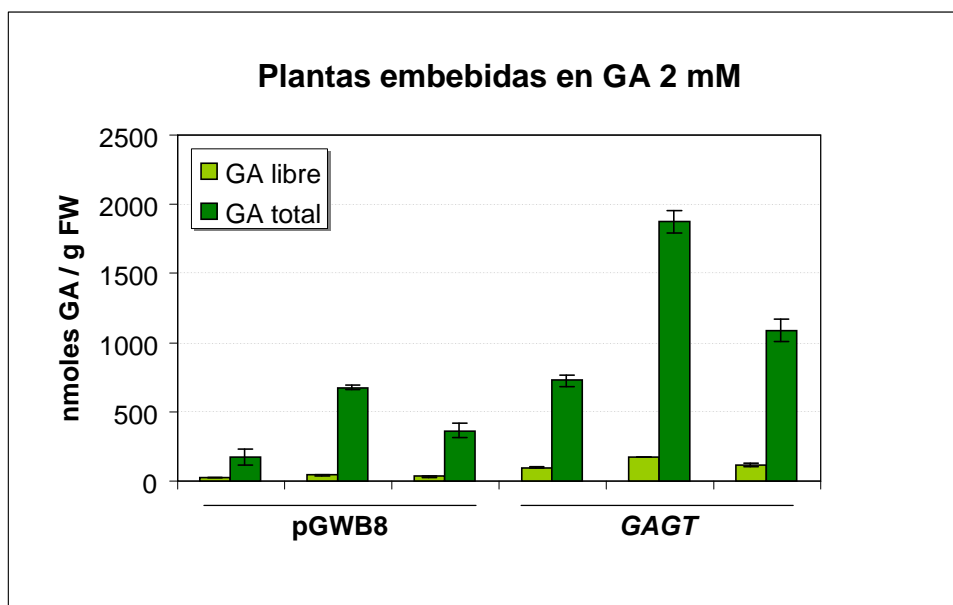


Figura 12. Acumulación de GA libre y total en plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con pGWB8_GAGT/p19 y sus correspondientes controles tras tratamiento con GA 2 mM. Análisis mediante HPLC de fluorescencia de extractos fenólicos de hojas de plantas agroinoculadas con pGWB8_GAGT/p19 (plantas GAGT) embebidas en una disolución de GA 2 mM, comparadas frente a hojas control agroinoculadas con pGWB8/p19 (plantas pGWB8). g FW: gramos peso fresco. Los datos mostrados corresponden a 3 réplicas biológicas, mientras que las barras de error corresponden a 3 réplicas técnicas.

Por lo que respecta a las incubaciones con SA, en la Figura 13 se representan gráficamente los resultados del contenido en SA libre y total acumulado en las plantas tras el tratamiento con SA 1 mM. De igual modo, los datos mostrados corresponden a 3 réplicas biológicas, mientras las barras de error corresponden a 3 réplicas técnicas. También en este caso los niveles de SA total son superiores a los libres en todas las plantas analizadas, aunque esta diferencia es menos acusada que en el caso del GA. De nuevo, se observa que las plantas GAGT presentan mayores niveles de acumulación de SA libre y conjugado que las plantas control, indicando que GAGT presenta actividad *in vivo* frente a SA en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Concretamente, en las plantas control, los niveles medios de SA libre y total son 70.03 nmoles/g de peso fresco y 305.85 nmoles/g de peso fresco, respectivamente, mientras las plantas GAGT presentan unos valores medios de SA libre de 250.09 nmoles/g FW y SA total de 548.45 nmoles/g FW. En este caso, las plantas GAGT han mostrado un aumento medio del 72% en los niveles de SA libre y del 44% en el contenido de SA total frente a las plantas control. Por lo tanto, la proteína recombinante GAGT expresada transitoriamente en *N. benthamiana* también parece mostrar cierta actividad glicosiltransferasa frente al SA. Sin embargo, la conjugación del

SA es menor que la del GA, como muestran los porcentajes de aumento en la cantidad de los compuestos fenólicos totales en cada caso. De hecho, es la primera vez que se detecta tal actividad frente a SA, puesto que la expresión de GAGT en *Pichia pastoris* tan sólo permitió la detección de la actividad frente a GA (Tárraga *et al.*, 2010).

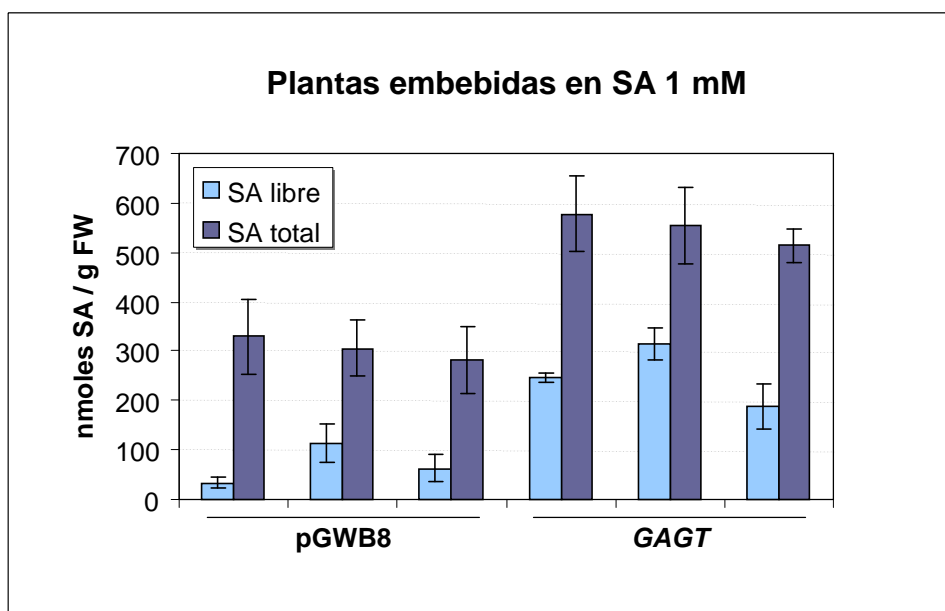


Figura 13. Acumulación de SA libre y total en plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con *pGWB8_GAGT/p19* y sus correspondientes controles tras tratamiento con SA 1 mM. Análisis mediante HPLC de fluorescencia de extractos fenólicos de hojas de plantas agroinoculadas con *pGWB8_GAGT/p19* (plantas *GAGT*) y embebidas en una disolución de SA 1 mM, frente a hojas control agroinoculadas con *pGWB8/p19* (plantas *pGWB8*). g FW: gramos peso fresco. Los datos mostrados corresponden a 3 réplicas biológicas, mientras que las barras de error corresponden a 3 réplicas técnicas.

Por último, en la Figura 14 se muestran gráficamente los contenidos de GA libre y total acumulado en las plantas tras el tratamiento con SA 1 mM. Se observa, tal y como se esperaba, que los tratamientos con SA producen la acumulación de GA, aunque sea a niveles bajos. A pesar de ello, se vuelve a detectar actividad GAGT frente a este compuesto fenólico. Así, en las plantas control, los niveles medios de GA libre y total son 3.69 nmoles/g de peso fresco y 12.51 nmoles/g de peso fresco, respectivamente. En cuanto a las plantas *GAGT*, éstas presentan unos valores medios de GA libre y total de 6.02 nmoles/g FW y 14.63 nmoles/g FW, respectivamente. Las plantas *GAGT* han mostrado un aumento medio del 38.8% en los niveles de GA libre y del 14.5% en el caso de niveles de GA total, respecto a las plantas control.

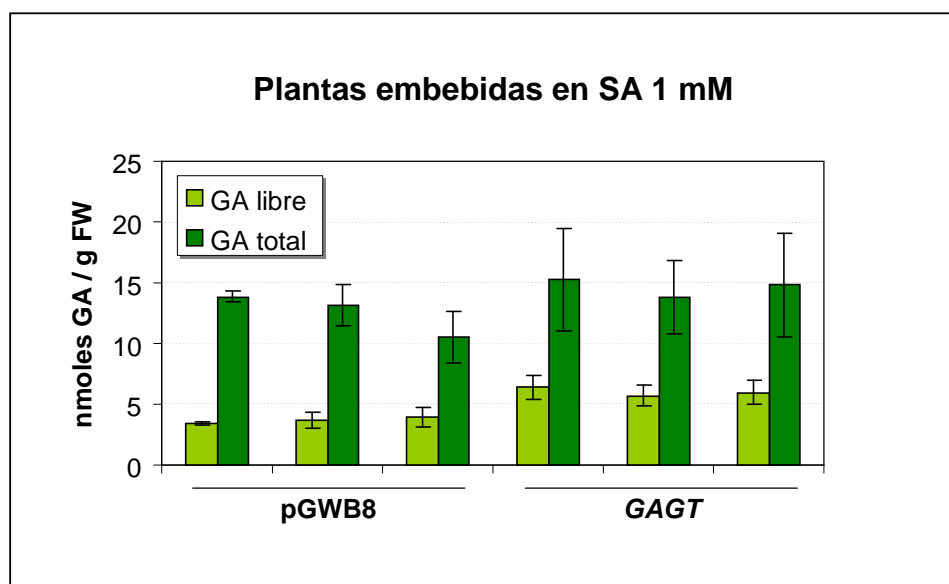


Figura 14. Acumulación de GA libre y total en plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con *pGWB8_GAGT/p19* y sus correspondientes controles tras tratamiento con SA 1 mM. Análisis mediante HPLC de fluorescencia de extractos fenólicos de hojas de plantas agroinoculadas con *pGWB8_GAGT/p19* (plantas GAGT) y embebidas en una disolución de SA 1 mM, frente a hojas control agroinoculadas con *pGWB8/p19* (plantas pGWB8). g FW: gramos peso fresco. Los datos mostrados corresponden a 3 réplicas biológicas, mientras que las barras de error corresponden a 3 réplicas técnicas.

A continuación se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos, con el fin de corroborar los resultados mostrados en las gráficas. En primer lugar, para contrastar la normalidad de los grupos se empleó el test de Shapiro-Wilk, resultando aceptada la hipótesis de normalidad en todos los casos ($p\text{-valor} > 0.05$). Seguidamente se realizó una prueba *t* para diferencia de medias de muestras independientes. En dicha prueba, si el *p*-valor (unilateral) obtenido se encuentra por debajo de 0.05, la diferencia de medias es estadísticamente significativa. Las Tablas que se muestran a continuación recogen los resultados obtenidos en el análisis estadístico (Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4).

Plantas agroinfiltradas embebidas en GA		
	GA libre (nmoles/g FW)	GA total (nmoles/g FW)
pGWB8	32.53 ± 8.33	403.93 ± 252.35
GAGT	127.31 ± 39.11	1228.7 ± 589.69
(GAGT - pGWB8) %	74.45	67.13
Sig. (t - test)	0.0075	0.045

Tabla 2. Acumulación de GA en plantas tratadas con GA en expresión transitoria del gen *GAGT* en *N. benthamiana*. *GAGT* y pGWB8: media y desviación estándar de GA acumulado en plantas infiltradas con la construcción pGWB8_ *GAGT* y el plásmido pGWB8, respectivamente. Los datos mostrados corresponden a la media de 3 repeticiones independientes. Sig. (t-test): p-valor obtenido en la prueba t para diferencia de medias de muestras independientes.

Plantas agroinfiltradas embebidas en SA		
	SA libre (nmoles/g FW)	SA total (nmoles/g FW)
pGWB8	70.03 ± 40.87	305.85 ± 24.08
GAGT	250.09 ± 63.32	548.45 ± 31.58
(GAGT - pGWB8) %	72	44.23
Sig. (t - test)	0.007	0.0001

Tabla 3. Acumulación de SA en plantas tratadas con SA en expresión transitoria del gen *GAGT* en *N. benthamiana*. *GAGT* y pGWB8: media y desviación estándar de SA acumulado en plantas infiltradas con la construcción pGWB8_ *GAGT* y el plásmido pGWB8, respectivamente. Los datos mostrados corresponden a la media de 3 repeticiones independientes. Sig. (t-test): p-valor obtenido en la prueba t para diferencia de medias de muestras independientes.

Plantas agroinfiltradas embebidas en SA		
	GA libre (nmoles/g FW)	GA total (nmoles/g FW)
pGWB8	3.69 ± 0.29	12.51 ± 1.74
GAGT	6.02 ± 0.34	14.63 ± 0.76
(GAGT - pGWB8) %	38.74	14.49
Sig. (t - test)	0.0005	0.063

Tabla 4. Acumulación de GA en plantas tratadas con SA en expresión transitoria del gen *GAGT* en *N. benthamiana*. *GAGT* y pGWB8: media y desviación estándar de GA acumulado en plantas infiltradas con la construcción pGWB8_ *GAGT* y el plásmido pGWB8, respectivamente. g FW: gramos de peso fresco. Los datos mostrados corresponden a la media de 3 repeticiones independientes. Sig. (t-test): p-valor obtenido en la prueba t para diferencia de medias de muestras independientes.

Atendiendo al p-valor obtenido en la prueba t, todos los resultados obtenidos son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), a excepción del contenido en GA total acumulado en plantas *GAGT* frente a plantas control, en el caso de plantas embebidas en SA. El hecho de que esta diferencia no sea tan notable puede deberse a los bajos niveles de GA acumulado en la planta cuando ésta ha sido embebida en SA, pues sólo un porcentaje muy bajo del SA libre pasa a GA. La baja acumulación de sustrato podría ser la causa del descenso en la actividad glicosiltransferasa de *GAGT* frente a GA. En el resto de los casos, la prueba t resultó estadísticamente significativa, por tanto reafirma lo mostrado previamente en los gráficos de barras: la proteína recombinante *GAGT* es activa y actúa como glicosiltransferasa de GA y SA al expresarse transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. Nuestros resultados indican que la construcción binaria pGWB8_*GAGT* obtenida permite la sobreexpresión en plantas y puede ser empleada en la generación de plantas transgénicas de tomate *GAGT*.

En cuanto a la acumulación de GA y SA, resulta curioso cómo no sólo los niveles totales son superiores en plantas *GAGT* respecto a plantas control, sino también los niveles de compuesto libre. En principio, cabría esperar una disminución en las formas libres de SA y GA, debido a la actividad glicosiltransferasa de la proteína recombinante *GAGT*. Sin embargo, este aumento en la acumulación del compuesto en su forma libre ya fue descrito en trabajos previos en los que se había llevado a cabo la sobreexpresión de una proteína glicosiltransferasa. Por ejemplo, plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum* cv Samsun NN) que sobreexpresan una glucosiltransferasa de escopoletina (TOGT), presentan mayores niveles de escopolina, su forma conjugada, pero también de escopoletina (forma libre), respecto a plantas control (Gachon *et al.*, 2004; Matros y Mock, 2004). Se ha observado el efecto contrario en plantas transgénicas de tabaco que regulan negativamente la expresión de TOGT, y que acumulan menores cantidades de escopoletina y escopolina que plantas control. La disminución en la expresión de TOGT podría estar modificando el equilibrio existente entre la forma libre (escopoletina) y la forma conjugada (escopolina). Al disminuir la cantidad de compuesto conjugado, el compuesto libre también reduce su acumulación, con el fin de reestablecer la homeostasis. Otra posible explicación sería que el hecho de reprimir la conjugación de un compuesto, regule negativamente el enzima o enzimas implicados en su ruta de biosíntesis, evitando así que se acumule en forma libre en grandes cantidades. Por último, se ha propuesto que la falta de conjugación de un compuesto activa un proceso de degradación del mismo, evitando así su hiperacumulación y los efectos negativos que ello pueda conllevar (Chong *et al.*, 2002). En plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. *Bugang*) fue identificada recientemente una UDP-

glucosiltransferasa 1 (CaUGT1) cuyo silenciamiento por *VIGS* redujo los niveles de SA libre y total acumulados frente a una infección con TMV en un 52% y un 48%, respectivamente, frente a plantas control también infectadas. Además, las plantas silenciadas presentaron un retraso respecto a los controles en la aparición de HR frente a la infección. Ello sugiere que el gen *CaUGT1* está implicado en la resistencia frente a la infección con TMV controlando la acumulación del SA (Lee *et al.*, 2009). En el presente trabajo se ha mostrado que la sobreexpresión de la glicosiltransferasa GAGT aumenta los niveles libres y totales de GA, y también de SA. Ello podría estar relacionado, del mismo modo que en el caso anterior, con un aumento en la resistencia frente a patógenos.

Paralelamente al estudio de GAGT, se llevó a cabo el ensayo de actividad *in vivo* para la proteína recombinante Twi1. Sin embargo, las plantas *Twi1* (agroinoculadas con pGWB9_*Twi1* / p19) embebidas en disoluciones de GA 2mM y SA 1 mM, no mostraron diferencias significativas en los niveles de GA o SA, tanto en forma libre como conjugada, respecto a las plantas control agroinoculadas con pGWB9/p19 (datos no mostrados). Al no detectar actividad diferencial entre plantas *Twi1* y plantas control, se plantearon varias posibilidades:

- 1) A pesar de haber detectado acumulación del transcrito de *Twi1*, éste podría no traducirse y, por tanto, la proteína podría no estar acumulándose.
- 2) La proteína recombinante podría estar siendo sintetizada y rápidamente degradada, por lo que no se estaría acumulando.
- 3) La proteína recombinante Twi1 podría estar acumulándose, pero no ser SA y/o GA sustratos apropiados.
- 4) La proteína recombinante podría estar acumulándose pero ser inactiva.

El primer paso sería, por tanto, estudiar si realmente la proteína recombinante Twi1 estaba presente en hojas de *N. benthamiana*, empleando la extensión de histidinas como blanco de inmunodetección. Además, ya que se había detectado actividad en los extractos de plantas GAGT, se podía emplear estos crudos como testigo de la presencia de la proteína recombinante GAGT, y por tanto, de la marca de 6xHis. Se procedió a realizar un análisis mediante *Western blot*, detectando las proteínas con un anticuerpo monoclonal Anti-His.

IV.2.4. Detección de las proteínas recombinantes GAGT y Twi1 en expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Debido a la ausencia de actividad detectada en plantas agroinfiltradas con la construcción pGWB9_*Twi1* frente a plantas control (infiltradas con pGWB9), a pesar de haber detectado previamente la presencia del cDNA recombinante *Twi1*, se procedió a la detección de la proteína en los tejidos agroinoculados, aprovechando la cola de histidinas añadida en el extremo N-terminal. Debido a que la proteína recombinante GAGT sí había mostrado actividad y también posee cola de histidinas, se emplearon extractos de las plantas *GAGT* como control positivo del inmunoensayo. Para ello se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) y posterior *Western blot*, como se detalla en Materiales y Métodos, a partir de extractos proteicos de hojas de plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con una u otra construcción. Se empleó el anticuerpo primario monoclonal Anti-His, que reconoce específicamente la extensión de histidinas. Como se muestra en la Figura 15, el anticuerpo reveló la presencia de la proteína recombinante GAGT en todas las plantas transgénicas agroinfiltradas con la construcción pGWB8_*GAGT*. Sin embargo, en el caso de plantas agroinfiltradas con la construcción pGWB9_*Twi1*, no se pudo detectar la proteína recombinante *Twi1* en ninguna de las muestras.

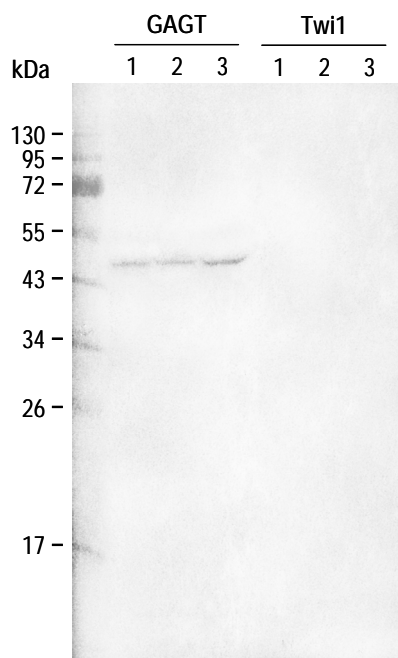


Figura 15. Detección de las proteínas recombinantes GAGT y Twi1 presentes en plantas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. GAGT 1, 2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB8_*GAGT*; Twi1 1,2 y 3: líneas de expresión transitoria pGWB9_*Twi1*. La detección de la proteína recombinante se realizó con el anticuerpo primario Anti-His, y el anticuerpo secundario Anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina.

Esta ausencia de proteína Twi1 no era, en principio, esperable, debido a la previa confirmación por RT-PCR de la expresión del cDNA *Twi1* recombinante, portador además de la secuencia nucleotídica que codifica los residuos de histidina. Sin embargo, la ausencia de actividad diferencial en plantas *Twi1* respecto a plantas control nos hacía sospechar que la proteína recombinante, de alguna manera, podría no estar presente en los tejidos o no ser activa. De forma general, podría haberse producido un fenómeno de silenciamiento post-transcripcional, donde el mensajero no se habría podido traducir finalmente a proteína. Otra opción podría ser que la proteína se hubiese sintetizado normalmente, pero hubiese sufrido un proceso de degradación. Así, por ejemplo, si la proteína recombinante hubiese sufrido un procesamiento en N-terminal que hubiera eliminado los residuos de histidina, sería imposible detectarla con el anticuerpo utilizado. Asimismo, cabría la posibilidad de que la cola N-terminal de histidinas pudiera haber desestabilizado la estructura final de la proteína, convirtiéndola en blanco de degradación.

En cualquier caso, los extractos de plantas agroinoculadas con Twi1 no mostraron actividad en los ensayos de actividad. Además, no fue posible detectar la proteína mediante *Western blot*. Todo ello indica que la proteína no se está sintetizando correctamente y que, por tanto, el uso de la construcción pGWB9_*Twi1* obtenida no es recomendable a la hora de llevar a cabo la transformación genética de plantas de tomate. Por ello, ya se ha iniciado el clonaje del cDNA de Twi1 en el plásmido pGWB8 para su sobreexpresión, esta vez con la extensión de histidinas en el extremo C-terminal, que pudiera dar lugar a una proteína activa de la misma manera que se ha obtenido para GAGT.

IV.3. Obtención de plantas transgénicas GAGT de tomate

Solanum lycopersicum es una planta de gran importancia económica a nivel mundial, sobre la cual se están llevando a cabo numerosas investigaciones con el fin de mejorar su cultivo. Las características de sus frutos carnosos convierten a esta planta en una especie de elevado interés agronómico. Por otra parte, las investigaciones en la genética del tomate (desarrollo de mapas genéticos, bibliotecas de mutantes, secuenciación del genoma) han progresado más que las del resto de miembros de la familia de las Solanáceas (patata, tabaco, pimiento, petunia), convirtiéndose en planta modelo para esta familia.

Sin embargo, parte de los estudios que faltan por completar en tomate son los relativos a los mecanismos de defensa frente a patógenos, sobre todo en interacciones de tipo compatible. Por otra parte, de las tres especies en las que se ha observado la acumulación de GA como consecuencia de una infección no necrotizante (tomate, pepino y *Gynura*), el tomate es la más fácil de transformar genéticamente. Por todo ello, resulta muy conveniente la obtención de plantas transgénicas *GAGT* de tomate que ayuden a esclarecer el papel señalizador del GA en la respuesta defensiva.

IV.3.1. Transformación genética de tomate “Moneymaker”

Para llevar a cabo la transformación genética de tomate, se seleccionó la variedad Moneymaker, dada la elevada eficiencia de transformación que posee. Por otra parte, en nuestro laboratorio se llevó a cabo una infección sistémica con ToMV o con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* de plantas de tomate cv. Moneymaker y se confirmó que esta variedad también acumula GA en altos niveles como consecuencia de infecciones sistémicas, no necrotizantes. Concretamente, el máximo de acumulación en dicho cultivar tiene lugar como consecuencia de la infección con ToMV, alcanzando unos niveles comparables a los descritos en infecciones de pepino con PNSRV o de *Gynura aurantiaca* con CEVd (Bellés *et al.*, 2006). Estos son los motivos que nos han llevado a elegir dicha variedad para llevar a cabo la transformación genética de tomate con el sistema binario pGWB8_*GAGT* que se ha obtenido en este trabajo.

La transformación genética se llevó a cabo mediante co-cultivo de explantes de cotiledón con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

En el momento de la presentación del presente Trabajo Final de Máster, la transformación se encuentra en el estadio de yemas resistentes a kanamicina, habiéndose realizado ya el primer subcultivo. En la Figura 16 se muestra la apariencia de las yemas en dicho momento.

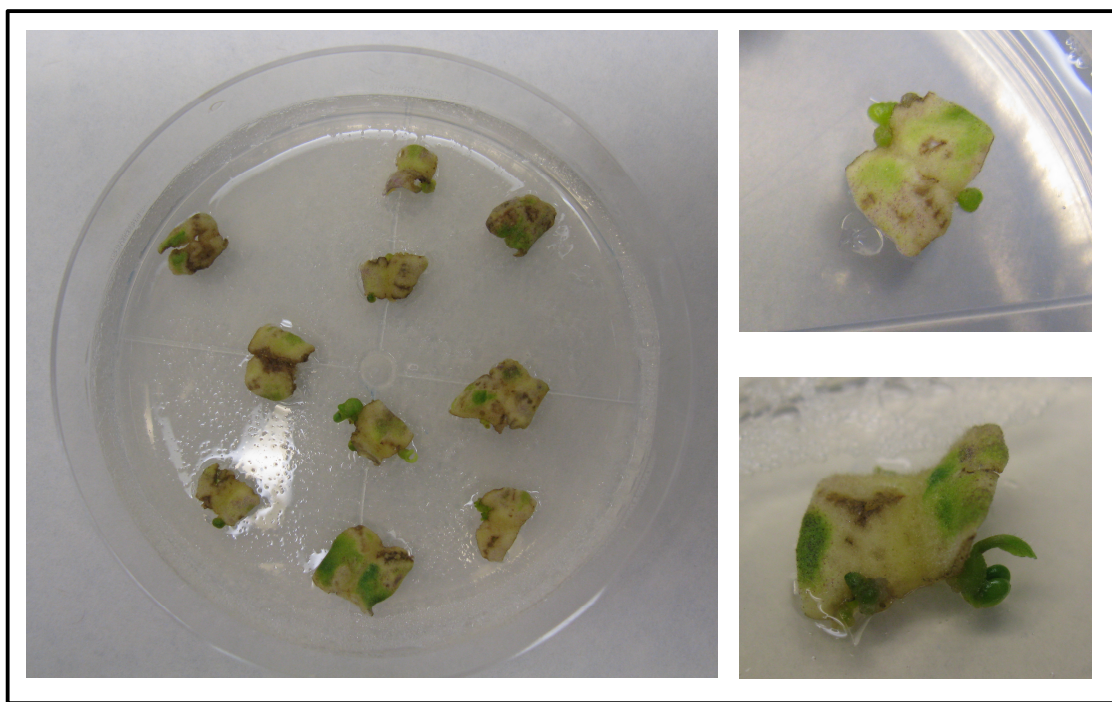


Figura 16. Cultivo con presión selectiva de la transformación de tomate cv. Moneymaker con la construcción pGWB8_GAGT. En la ampliación se aprecia el aspecto de las yemas resistentes a kanamicina.

Tras subcultivos sucesivos, se pretende obtener ápices resistentes a kanamicina que, una vez enraizados, serán aclimatados en el invernadero para la obtención de las semillas correspondientes.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

En cuanto a la proteína de tomate inducida por herida (Twi1), se está trabajando actualmente en la obtención de un nuevo clon de expresión que dé lugar a una proteína recombinante activa, y que permita llevar a cabo los ensayos de actividad. La caracterización de Twi1 y su implicación en la respuesta defensiva de la planta de tomate frente a infecciones patogénicas supondría un importante hallazgo, más aún si se trata de una glicosiltransferasa específica de ácido salicílico, dada la relevancia de dicho compuesto como molécula señal en la interacción planta-patógeno.

Respecto a la glicosiltransferasa de ácido gentísico (GAGT), una vez obtenidas las líneas homocigotas de plantas de tomate *GAGT* se analizarán los niveles de acumulación de GA y SA, tanto en forma libre como conjugada, frente a diferentes infecciones. Como podríamos esperar a partir de los resultados de este Trabajo, si se comprueba que las plantas presentan niveles de GA y SA superiores respecto a plantas control no transgénicas, se llevarán a cabo estudios de resistencia.

En concreto, se pretende llevar a cabo dichos estudios utilizando ToMV como patógeno sistémico. Dicho virus produce una gran acumulación de GA en plantas MoneyMaker, y su presencia puede cuantificarse fácilmente por detección de la proteína de la cápside viral mediante SDS/PAGE. De esta forma, además, se puede estudiar la presencia del virus en tejidos infectados y también distales. Esperamos que las plantas transgénicas *GAGT* de tomate, al igual que ocurre en los ensayos de actividad realizados con plantas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, sean capaces de acumular niveles superiores de GA y SA en respuesta a la infección con ToMV. Ello daría lugar a plantas más resistentes a la infección, a nivel local, distal o ambos, como se ha observado previamente en otros estudios (Matros y Mock, 2004; Lorenc-Kukula *et al.*, 2005, 2009). Asimismo, se realizarán inoculaciones con el CEVd para determinar el grado de resistencia a dicho patógeno.

Las plantas *GAGT* proporcionarán una valiosa información sobre la activación de las defensas ante situaciones de estrés biótico y abiótico, así como acerca del papel que GA y SA juegan en estas respuestas. Será igualmente interesante estudiar otros posibles efectos pleiotrópicos de la posible sobreacumulación de SA y GA en dichas plantas.

Nuestro laboratorio está desarrollando una aproximación multidisciplinar (Bioquímica, Molecular, Genómica, Proteómica y Metabolómica) para esclarecer el significado del ácido gentísico en la interacción planta-patógeno. Así pues, esperamos que las plantas transgénicas Moneymaker *GAGT* constituyan un excelente sistema para estudiar el papel del GA y el SA en la respuesta defensiva de las plantas.

V. Conclusiones

V. CONCLUSIONES

1. Se ha obtenido una construcción binaria (pGWB8_GAGT) que permite la sobreexpresión en plantas del cDNA de la glicosiltransferasa de ácido gentísico de tomate (GAGT), fusionado a 6 histidinas. Paralelamente, se ha obtenido una construcción binaria (pGWB9_Twi1) que permite la sobreexpresión en plantas del cDNA de la proteína de tomate inducida por herida (Twi1), también fusionado a 6 histidinas.
2. La proteína recombinante GAGT presenta actividad glicosiltransferasa frente a ácido gentísico (GA) y ácido salicílico (SA) en ensayos de actividad realizados mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. El enzima recombinante puede detectarse con un anticuerpo monoclonal Anti-His.
3. Los estudios de expresión transitoria de la construcción pGWB9_Twi1 en *Nicotiana benthamiana* muestran ausencia de actividad glicosiltransferasa frente a ácido gentísico (GA) y ácido salicílico (SA). No puede detectarse Twi1 recombinante con un anticuerpo monoclonal Anti-His.
4. Se ha iniciado el clonaje del cDNA de Twi1 en el plásmido pGWB8 para dar lugar a la sobreexpresión de una proteína activa, de la misma manera que se ha obtenido para GAGT.
5. Se han iniciado los trabajos conducentes a la obtención de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresen la actividad GAGT. Hasta la fecha, se ha obtenido una serie de yemas resistentes a kanamicina como resultado de la transformación de tomate cv. Moneymaker con la construcción pGWB8_GAGT.

VI. Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adie BA, Perez-Perez J *et al* (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681
- Achnine L, Huhman DV, Farag MA, Sumner LW, Blount JW and Dixon RA (2005) Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 41: 875-887
- Aksamit-Stachurska A, Korobczak-Sosna A, Kulma A and Szopa J (2008) Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway BMC Biotechnol. 8: 25
- Álvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442
- Armah, CN, Mackie AR, Roy C, Price K, Osbourn AE, Bowyer P and Ladha S (1999) The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys J.* 76: 281-290
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B and Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 721-733
- Balaji V and Sessa G (2008) Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive bacterium. *Plant Signal Behav.* 3:839-41
- Balbi V and Devoto A (2008) Jasmonate signaling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New phytol* 177: 301-318
- Bari R and Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 694: 473-488
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I and Conejero V (2006) Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant- pathogen interactions. *Planta* 223: 500-511
- Bellés JM, Garro R, Navarro P, Primo J and Conejero V (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12 (3): 227-235
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-21
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K and Poppenberger B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Plant Biol.* 8: 254-263
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC and Cammue BPA (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393-416
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA and Mason JG (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* 19: 441-451
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J and Klessig DF (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4134-4137
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B and Saindrenan P (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell.* 14: 1093-1107
- Chong J, Baltz R, Fritig B and Saindrenan P (1999) An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett.* 458: 204-208
- Conejero V, Bellés JM, García-Breijo F, Garro R, Hernández-Yago J, Rodrigo I and Vera P (1990) Signaling in Viroid Pathogenesis. Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. Springer-Verlag. Heidelberg. RFA: 233-263
- Conejero V and Granell A (1986) Stimulation of a viroid-like syndrome and the impairment of viroid infection by silver ions. *Physiol. and Molec. Plant Pathol.* 29: 317-323
- Conejero V and Semancik JS (1977) Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol.* 67: 1424-1426
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ and Henrissat B (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328: 307-317
- Dean JV, Mohammed LA and Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta.* 221: 287-296
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E and Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250
- Dempsey DA, Shah J and Klessig DF (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547-575

- Desender S, Andrivon D and Val F (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology* 9: 21-30
- Ebel J and Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev.Cytol.* 148: 1-36
- Edwards R (1994) Conjugation and metabolism of salicylic acid in tobacco. *J. Plant Physiol.* 143: 609-614
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA and Moreno V (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent [corrected]. *Theor Appl Genet.* 106: 231-8
- Enyedi AJ and Raskin I (1993) Induction of UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase activity in TMV-inoculated tobacco leaves. *Plant Physiol.* 101: 1375-1380
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P and Raskin I (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2480-2484
- Fasmer Hansen S, Bettler E, Rinnan A, Engelsen SB and Breton C (2010) Exploring genomes for glycosyltransferases. *Mol. BioSyst.* 6: 1773-1781
- Fayos J, Bellés JM, López-Gresa MP, Primo J and Conejero V (2006) Induction of gentisic acid 5-O- β -D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 67: 142-148
- Fleming AJ, Mandel T, Roth I and Kuhlemeier C (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309
- Fraissinet-Tachet L, Baltz R, Chong J, Kauffmann S, Fritig B and Saindrenan P (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* 437: 319-323
- Frydman A, Weissshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J and Eyal Y (2004) Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.* 40: 88-100
- Fuenmayor SL, Wild M, Boyes AL, Williams PA (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. *J Bacteriol.* 180: 2522-30
- Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Hase T and Tanaka Y (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiol.* 132: 1652-1663
- Gachon CM, Langlois-Meurinne M and Saindrenan P (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10: 542-549
- Gachon C, Baltz R and Saindrenan P (2004) Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol. Biol.* 54: 137-146
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Ukness S, Ward E, Kessmann H and Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-227
- Granell A, Bellés JM and Conejero V (1987) Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 83-90
- Hans J, Brandt W and Vogt T (2004) Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Plant J.* 39: 319-333
- Hart GW, Housley MP and Slawson C (2007) Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446: 1017-1022
- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J and Klessig DF (1993) Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4: 593-600
- Hirota M, Kuroda R, Suzuki H and Yoshikawa T (2000) Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta* 210: 1006-1103
- Horvath DM and Chua NH (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31: 1061-1072
- Hou B, Lim EK, Higgins GS and Bowles DJ (2004) N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 47822-47832
- Hughes J and Hughes MA (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.* 5: 41-49

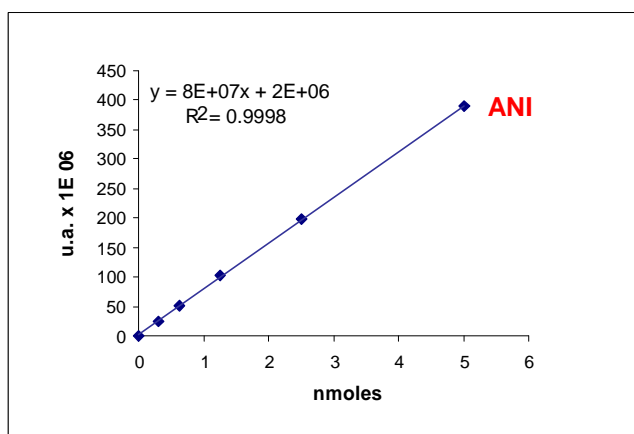
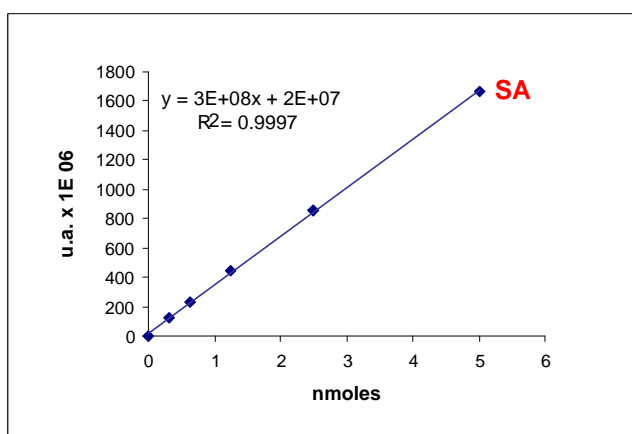
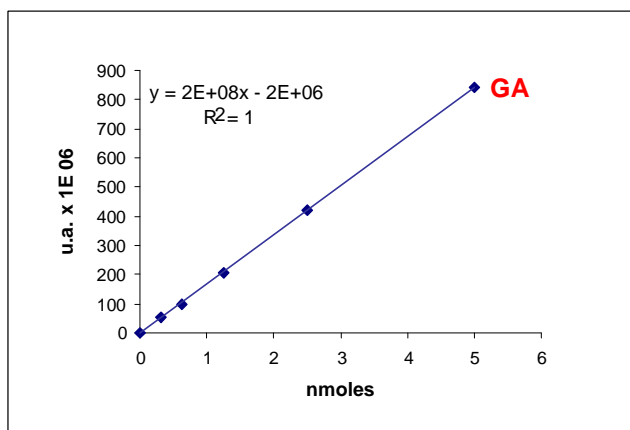
- Ibrahim RK and Towers GH (1959) Conversion of salicylic acid to gentisic acid and o-pyrocatechuic acid, all labelled with carbon-14 in plants. *Nature* 184: 1803
- Jones JDG and Dangl J (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jones P and Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174
- Kim JH, Campbell BC, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ and May GS (2007) Enhancement of fluodioxonil fungicidal activity by disrupting cellular glutathione homeostasis with 2,5-dihydroxybenzoic acid. *FEMS Microbio Lett.* 270: 284-290
- Kita M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG and Omura M (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Lett.* 469: 173-178
- Kroon J, Souer E, de Graaff A, Xue Y, Mol J and Koes R (1994) Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus *Rt* of *Petunia hybrida*: characterization of insertion sequences in two mutant alleles. *Plant J.* 5: 69-80
- Kubo A, Arai Y, Nagashima S and Yoshikawa T (2004) Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch. Biochem. Biophys.* 429: 198-203
- Kunkel BN and Brooks DM (2002) Cross talk between signalling pathways in pathogen defense. *Trends in plant science* 2: 379-384
- Langlois-Meurinne M, Gachon C MM and Saindrenan P (2005) Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 1890-1901
- Lattanzio V, De Cicco D, Venere D, Lima G and Salerno M (1994) Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Ital. J. Food Sci.* 6: 23-30
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S and Ryals J (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 863-870
- Lee B-J, Kim S-K, Choi SB, Bae J, Kim K-J, Kim Y-J and Paek K-H (2009) Pathogen-inducible CaUGT1 is involved in resistance response against TMV infection by controlling salicylic acid accumulation. *FEBS letters* 583: 2315-2320
- Lee HI and Raskin I (1999) Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274: 36637-36642
- Lee HI and Raskin I (1998) Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* 88: 692-697
- Lim EK and Bowles DJ (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J.* 23: 2915-2922
- Lim EK, Doucet CJ, Li Y, Elias L, Worrall D, Spencer SP, Ross J and Bowles DJ (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J. Biol. Chem.* 277: 586-592
- Lim EK, Li Y, Parr A, Jackson R, Ashford DA and Bowles DJ (2001) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 276: 4344-4349
- Loake G and Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(5): 466-472
- López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH and Verpoorte R (2010) Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem Anal.* 21: 89-94
- Lorenc-Kukula K, Zuk M, Kulma A, Czemplik M, Kostyn K, Skala J, Starzycki M and Szopa J (2009) Engineering Flax with the GT Family 1 *Solanum soganandinum* Glycosyltransferase SsGT1 Confers increased Resistance to *Fusarium* infection. 57: 6698-6705
- Lorenc-Kukula K, Jafra S, Oszmianski J and Szopa J (2005) Ectopic expression of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53: 272-281
- Lorenzo O and Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 532-540
- Lutwak-Mann C (1943) The excretion of a metabolic product of salicylic acid. *Biochem. J.* 37: 246
- Mackowiak PA (2000) Brief history of antipyretic therapy. *Clin. Infect. Dis.* 31: S154-S156
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA and Lamb CJ (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7802-7806

- Malamy J, Hennig J and Klessig DF (1992) Temperature-Dependent Induction of Salicylic Acid and Its Conjugates during the Resistance Response to Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Cell*. 4: 359-366
- Matros A and Mock HP (2004) Ectopic expression of a UDP-glucose:phenylpropanoid glucosyltransferase leads to increased resistance of transgenic tobacco plants against infection with Potato Virus Y. *Plant Cell Physiol* 45: 1185-1193
- Messner B, Thulke O and Schaffner AR (2003) Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta*. 217: 138-146
- Métraux JP, Siger H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Guadin J, Raschdoorf K, Schmid E, Blum W and Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006
- Moehs CP, Allen PV, Friedman M and Belknap WR (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J*. 11: 227-236
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 266-277
- Mur LAJ, Bi YM, Darby RM, Firek S and Draper J (1997) Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV infected tobacco. *Plant J*. 12: 1113-1126
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, Watanabe Y and Nakamura K (2007) Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (8): 2095-2100
- Naranjo MA, Romero C, Bellés JM, Montesinos C, Vicente O and Serrano R (2003) Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta* 217: 417-424
- Nobuta K, Okrent RA, Stoutemyer M, Rodibaugh N, Kempema L, Wildermuth MC and Innes RW (2007) The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 144: 1144-1156
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B and Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249-266
- Nürnberg T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 167-182
- O'Donnell PJ, Schemelz EA, Moussatche P, Lund ST, Jones JB and Klee HJ (2003) Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J*. 33: 245-257
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J and Klee HJ (2001) Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J*. 25: 315-323
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, Dorans A, Roberts MR and Bowles DJ (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J*. 14: 137-142
- Paquette S, Moller BL and Bak S (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*. 62: 399-413
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116
- Pierpoint WS (1997) The natural history of salicylic acid: plant product and mammalian medicine. *Interdisciplinary Science Reviews* 22: 45-52
- Pieterse CMJ, Ton J, van Loon LC (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotech Net.* 3
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glossl J, Luschnig C and Adam G (2003) Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 47905-47914
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA and Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*. 238: 336-341
- Roychoudhury R and Pohl N LB (2010) New structures, chemical functions, and inhibitors for glycosyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14: 168-173
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3
- Schulze K, Schreiber L and Szankowski I (2005) Inhibiting effects of resveratrol and its glucoside piceid against *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *J. Agric. Food Chem.* 53: 356-362
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-367
- Staal J, Dixelius C (2007) Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends Plant Sci.* 12: 334-342

- Sticher L, Mauch-Mani B and Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270
- Stochmal A, Iwona Kowalska I, Bogdan Janda B, Perrone A, Sonia Piacente S and Olesze W (2009) Gentisic acid conjugates of *Medicago truncatula* roots. *Phytochemistry* 70 (10): 1272-1276
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N and Okazaki M (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J. Biochem.* 268: 4086-4094
- Taguchi G, Fujikawa S, Yazawa T, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M and Okazaki M (2000) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci.* 151: 153-161
- Taguchi G, Imura H, Maeda Y, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M and Okazaki M (2000) Purification and characterization of UDP-glucose:hydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells. *Plant Sci.* 157: 105-112
- Tárraga S, Lisón P, López-Gresa MP, Torres C, Rodrigo I, Bellés JM and Conejero V (2010) Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid. *J. Exp. Bot.* 61 (15): 4325-4338
- Thilmony R, Underwood W and He SY (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46: 34-53
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuwara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M and Saito K (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J.* 42: 218-235
- Towbin H, Staehlin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X and Holuigue L (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 17: 34-42
- Vetter J (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon.* 38: 11-36
- Vogt T and Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5: 380-386
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33(5):949-56
- Walker N and Evans WC (1952) Pathways in the metabolism of the monohydroxybenzoic acids by soil bacteria. *Biochem. J.* 52: 23
- Wang X (2009) Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS letters* 583: 3303-3309
- Werner C and Matile P (1985) Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* 118: 237-249
- Whetten R and Sederoff R (1995) Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G and Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414: 562-565
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D and Xie D (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 1919-1935
- Xu ZJ, Nakajima M, Suzuki Y and Yamaguchi I (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol.* 129: 1285-1295
- Yalpani N, León J, Lawton M and Raskin I (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321
- Yalpani N, Shulz M, Davis MP and Balke NE (1992) Partial purification and properties of an inducible uridine-5'diphosphate-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from oat roots. *Plant Physiol.* 100: 457-463
- Yang H, Morita A, Matsubayashi Y, Nakamura K and Sakagami Y (2000) A rapid and efficient system of Agrobacterium infection-mediated transient gene expression in rice Oc cells and its application for analysis of the expression and antisense suppression of preprophytosulfokine, a precursor of phytosulfokine-a, encoded by OsPSK gene. *Plant Cell Physiol.* 41:811-6
- Zhao S and Qi X (2008) Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 799-807

VII. Anexos

VII. ANEXOS



A1. Curvas patrón para el ácido gentísico (GA), ácido salicílico (SA) y ácido anísico (ANI). Curvas patrón obtenidas a partir de 5 muestras de concentración conocida de GA, SA y ANI, respectivamente. El GA, SA y ANI se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm.

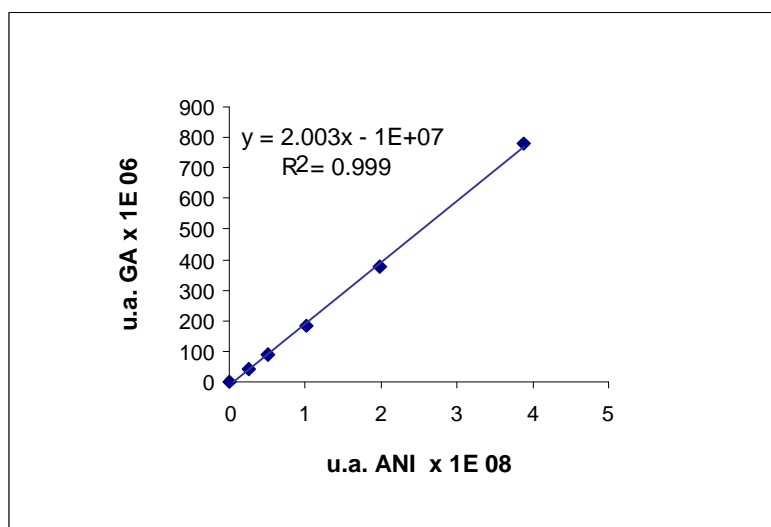


Figura A2. Curva de calibración lineal de ácido gentísico (GA) empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno, en el rango de concentraciones de trabajo (0 – 5 nmoles). Curva patrón obtenida a partir de 5 muestras de concentración conocida de GA y ANI. Los compuestos se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm.

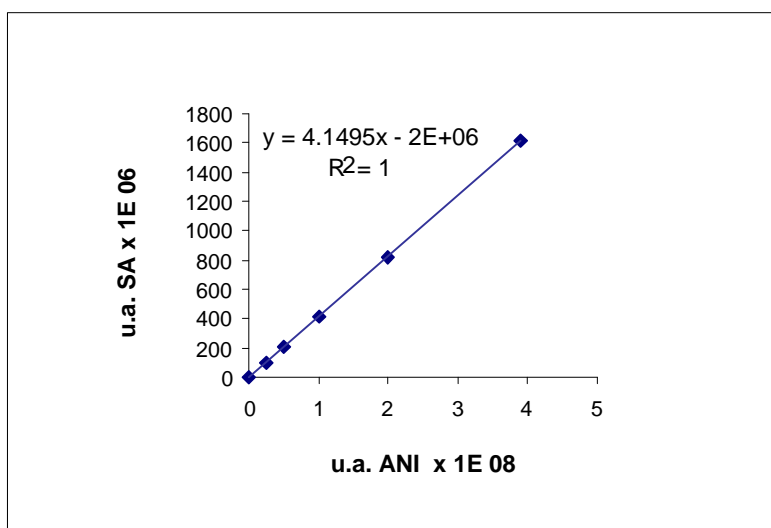


Figura A3. Curva de calibración lineal de ácido salicílico (SA) empleando ácido anísico (ANI) como patrón interno, en el rango de concentraciones de trabajo (0 – 5 nmoles). Curva patrón obtenida a partir de 5 muestras de concentración conocida de SA y ANI. Los compuestos se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una λ de excitación de 313 nm y un λ de emisión de 405 nm.

